

Walter Möbus

UNTERSUCHUNGEN ZUM
WIRKUNGSMECHANISMUS
DER LOKALANAESTHETIKA

Frankfurt am Main 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546410_0024



Druck: Bildstelle der J. W. Goethe-Universität
Frankfurt a. M.

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS
DER LOKALANAESTHETIKA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der

Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Walter Möbus
Frankfurt am Main

1966

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

1. Gutachter: Priv.Do. Dr. Th.Eckert

2. Gutachter: Prof.Dr. H.Oelschläger

Dekan: Prof.Dr. H.Staude

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.1966

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	4
2.1.	Zur Physiologie der Nervenenerregung	6
2.2.	Die enge Verbindung des Thiamins mit dem Na^+ - Einstrom in der ersten Phase der Nervenenerregung	11
2.3.	Die Lokalisation des Thiamins im Nerv	14
2.4.	Die Komplexe der Thiaminphosphorsäure-Ester mit Na^+ - und K^+ -Ionen	18
2.5.	Die verschiedenen Phosphorylierungsstufen des Thiamins im Nerv	22
2.6.	Zum Problem des biochemischen Mechanismus der Nervenenerregung	28
3.1.	Diskussion der bisher vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus der Lokal- anaesthetika	34
3.2.	Die Komplexe der Lokalanaesthetika mit Thiamin	39
3.3.	Die Komplexe der Lokalanaesthetika mit Adenin bzw. Adeninnucleotiden	53
3.3.1.	Untersuchung der Lokalanaesthetika-Adenin-Komplexe mit Hilfe der Solubilisationsmethode	53
3.3.2.	Spektrophotometrische Untersuchung der Komplex- bildung zwischen Lokalanaesthetika und AMP	60

	<u>Seite</u>
3.3.3. Enzymkinetische Untersuchungen zum Nachweis der Lokalanaesthetikum-ATP-Komplexe	66
3.4. Zur Frage des Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika	81
3.5. Beziehung zwischen leitungsanaesthetischer Wirksamkeit, 84 Verteilungskoeffizient und Komplexbildungskonstanten einer Reihe von homologen und isomeren Alkoxybenzoe- säurediaethylaminoäthylestern	84
4. Experimenteller Teil	90
5. Zusammenfassung	100
6. Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung

In neuerer Zeit gewinnt ein Teilgebiet der pharmazeutisch-chemischen Forschung immer mehr an Bedeutung: die Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Arzneimitteln.

Während mit pharmakologischen Methoden die Gesamtwirkung eines Pharmakons auf den Organismus bzw. ein isoliertes Organ erfaßt wird, versucht man durch pharmazeutisch-biochemische und physikalische Untersuchungen zu erkennen, welche Faktoren auf molekularbiologischer Stufe zur Arzneimittelwirkung beitragen und in welcher Weise durch deren Zusammenwirken das Phänomen der pharmakologischen Wirkung zustande kommt.

Zu diesen Faktoren zählen vor allem:

- 1.) Resorptions- und Verteilungseigenschaften des Pharmakons, die wiederum die Anreicherung am Wirkort entscheidend beeinflussen.
- 2.) Die Fähigkeit des Pharmakons, in physiologische und pathologische Vorgänge am Wirkort einzugreifen und
- 3.) chemische Veränderungen, die das Arzneimittel möglicherweise durch den Stoffwechsel im Organismus erfährt.

Zur Bearbeitung dieser Problemstellung bedient man sich vor allem physiologisch-chemischer, biochemischer und physikochemischer Erkenntnisse und Methoden.

Auf Grund solcher Untersuchungen können heute für eine

ganze Reihe von Arzneimitteln mögliche Wirkungsmechanismen angegeben werden, etwa für die Sulfonamide (1), für Diuretica vom Typ der Acetazolamide (2) und einige andere. Dabei wurde festgestellt, daß Pharmaka häufig Antimetaboliten physiologischer Substrate sind.

Solche Untersuchungen sind von doppeltem Interesse: Einmal weil die gewonnenen Ergebnisse von allgemeinem Erkenntniswert sind, zum anderen, weil aus diesen Erkenntnissen Schlüsse für die Synthese von in Wirkung und Toxizität verbesserten Arzneimitteln gezogen werden können. Im Idealfall ist somit eine gezielte Synthese neuer Pharmaka denkbar.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, einen Beitrag zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika zu geben.

Die Gruppe der Lokalanästhetika scheint für solche Untersuchungen deshalb besonders geeignet, weil über die Physiologie der Reizleitung im Nerven und den Wirkort sehr viel bekannt ist, die Resorptionsbedingungen relativ leicht überschaubar sind und sehr viel experimentelles Material über pharmakologische und physikochemische Untersuchungen vorhanden ist.

2.1 Zur Physiologie der Nervenenerregung

Will man den Wirkungsmechanismus eines Pharmakons kennenlernen, so muß zunächst der normale physiologische Reaktionsablauf bekannt sein, in den das Arzneimittel eingreift. Deshalb soll zunächst kurz auf die Physiologie der Reizleitung im Nerven eingegangen werden.

Die Baueinheit des Nervengewebes ist die Nervenzelle, das Neuron (vgl. Abb. 1). Das Neuron weist kurze Fortsätze, die Dendriten, und lange Fortsätze, die Neuriten, auf. Die Neuriten können eine Länge von einem Meter erreichen und dienen der Reizleitung über lange Strecken, während die Dendriten sich in der Nähe des Neurons verzweigen und die einzelnen Nervenzellen verbinden.

Die Nervenzelle wird von einer doppelschichtigen Membran aus Phospholipiden und Proteinen begrenzt (3). Bei höher entwickelten Tieren sind die Neuriten von einer Markscheide umgeben. Im Abstand von etwa einem Millimeter zeigt die Markscheide Einschnürungen, die sogenannten Ranvierschen Knoten. Hier ist das Nerveninnere (Axoplasma) nur durch die Nervenmembran von der umgebenden Zellflüssigkeit getrennt. Alle Vorgänge, die zur Erregung des Nerven führen, spielen sich an diesen Knoten ab (4-6). Man hat zeigen können, daß die Erregungsleitung saltatorisch von Knoten zu Knoten erfolgt (7-10). Die Voraussetzung für die Entstehung der Nervenenerregung ist in der ungleichen Verteilung der Ionen auf beiden Seiten der

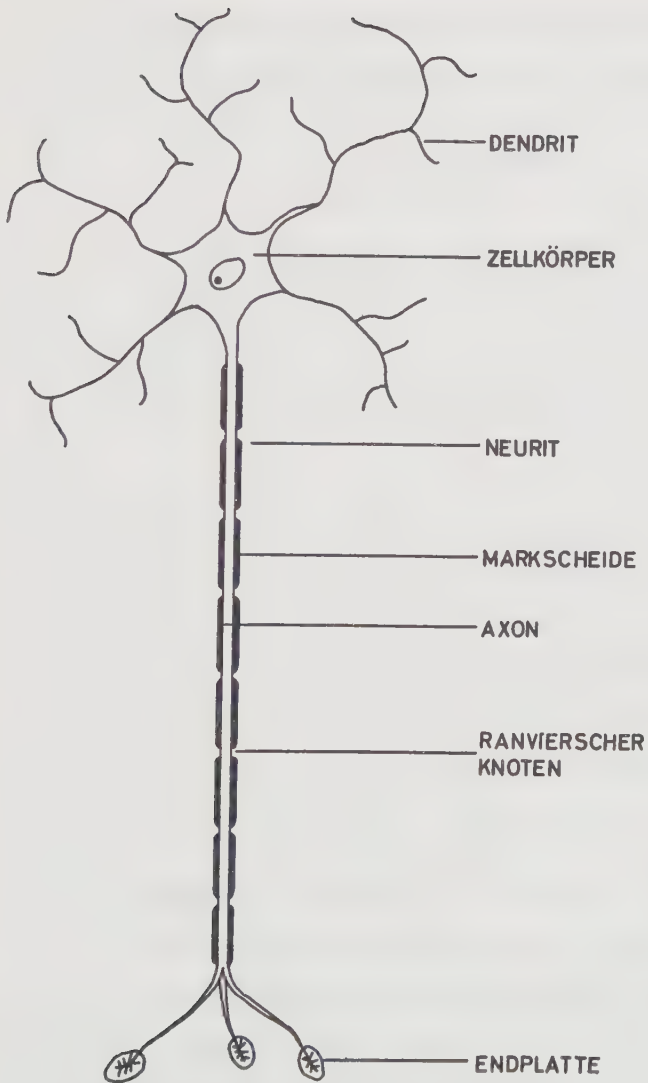


Abb. 1 Schematische Darstellung einer Nervenzelle

Nervenmembran zu sehen. Für die besonders leicht zu untersuchenden Riesennervenfasern des Kalmars (*Loligo pealii*) werden von Hodgkin (11) folgende Werte angegeben:

Tabelle 1

Die Ionenverteilung im Nerv von *Loligo pealii*

	K^+ (mMol/l)	Na^+ (mMol/l)	Cl^- (mMol/l)
Axoplasma	410	49	40
Außenseite	22	440	560

Bei anderen Tierarten wurden ähnliche Verhältnisse gefunden. Im Ruhezustand ist die Membran für Na^+ -Ionen praktisch undurchlässig, während sie für K^+ - und Cl^- -Ionen bis zu einem gewissen Grad passierbar ist. Das Ungleichgewicht wird durch die der Diffusion entgegengerichtete sogenannte K^+ - Na^+ -Pumpe aufrechterhalten, die unter Verbrauch von Energie (12-14) über einen aktiven Transport-Mechanismus Na^+ -Ionen von innen nach außen und K^+ -Ionen von außen nach innen pumpt (15-17).

Die geschilderten Verhältnisse haben ein Spannungsgelände zwischen dem Axoplasma und der Außenseite der Nervenmembran zur Folge, das sogenannte Ruhepotential. Es beträgt im Durchschnitt etwa 60 -90 mV, außen positiv gegen innen und ist in erster Näherung als K^+ - bzw. Cl^- -Diffusionspotential aufzufassen (12,18,19).

Beim Erregungsvorgang kommt es zunächst zu einem starken Na^+ -Ionen-Einstrom. Dadurch wird das Membranpotential umgekehrt (20). Weidmann (21) und Kilb und Stämpfli (22) gelang es, mit Hilfe einer in das Axoplasma eingeführten coaxialen Innenelektrode und einer zweiten Mikroelektrode auf der Membranaußenseite diese Potentialänderung zu verfolgen. Nach Weidmann (23) und Lüttgau (24) ist die Steilheit der Potentialänderung $\frac{dV}{dt}$ ein Maß für die einströmende Na^+ -Menge. Kurze Zeit nach dem Beginn des Na^+ -Einstroms setzt ein zunächst schwacher K^+ -Ausstrom ein, der langsam anschwillt und schließlich wieder eine Umkehrung des Aktionspotentials bewirkt. Keynes (25) fand, daß pro Erregungsvorgang $4 \cdot 10^{-12}$ Mol Na^+ -Ionen und $3 \cdot 10^{-12}$ Mol K^+ -Ionen pro cm^2 Nervenoberfläche verschoben werden. Die Wiederherstellung der ursprünglichen Ionenverteilung wird von der Na^+ - K^+ -Pumpe besorgt.

Auf Grund der Tatsache, daß in der ersten Erregungsphase zunächst nur Na^+ -Ionen in den Nerv einströmen, der K^+ -Ionen-Ausstrom aber erst zeitlich verzögert und langsam erfolgt, zogen Hodgkin (20), Krogh (26), Hodgkin, Huxley und Katz (27) und Hodgkin und Huxley (28) den Schluß, daß dieser Na^+ -Ionen-Einstrom über ein spezielles Na^+ -Ionen-Transportsystem erfolgen müsse.

Dieses System ist zunächst einmal wohl zu unterscheiden von dem Transportsystem der Natrium-Kalium-Pumpe des Ruhe-Transports, zu dem vor allem Skou (29-32) und Hokin (33-34) Modellvorstellungen und experimentelles Material geliefert haben.

Im Gegensatz zu diesen a k t i v e n T r a n s -
p o r t v o r g ä n g e n handelt es sich bei dem
Einstrom von Na^+ -Ionen in der ersten Erregungsphase
nach den oben angeführten Befunden (20,26-28) um eine
c a r r i e r - v e r m i t t e l t e D i f f u s i o n
in Richtung eines Konzentrationsgradienten.

In Anlehnung an Netter (35) und Skou (29-32) muß ein
Stoff auf Grund theoretischer Überlegungen eine Reihe
von Voraussetzungen erfüllen, wenn er als Carrier für
den Na^+ -Einstrom in der ersten Erregungsphase fungieren
soll:

- 1.) Der Trägerstoff muß eng mit dem Na^+ -Transport ver-
bunden sein. Ohne seine Anwesenheit darf ein Na^+ -
Einstrom nicht erfolgen.
- 2.) Der Träger muß in oder an der Nervenmembran vor-
kommen und durch die Membran hindurchtreten können.
- 3.) Der Trägerstoff muß mit den zu transportierenden
 Na^+ -Ionen eine Bindung, wahrscheinlich komplexer
Art, eingehen können.
- 4.) Der Carrier muß in mindestens zwei Zuständen auf-
treten, nämlich in einem Ruhezustand und in einem
Aktionszustand.

Im Gegensatz zu einer Trägersubstanz im Ionentransport-
system des aktiven Ruhetransports muß der Träger bei
einer carrier-vermittelten Diffusion keine besonders
hohe Affinität für Na^+ -Ionen in K^+ -reichem Milieu be-
sitzen und umgekehrt.

In den folgenden vier Abschnitten soll untersucht werden, inwieweit Thiamintriphosphat (TTP) die unter 1-4 gemachten Voraussetzungen erfüllt.

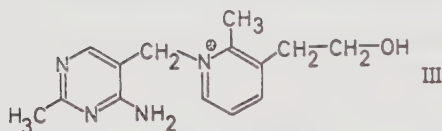
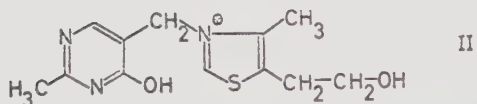
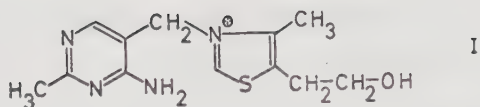
2.2 Die enge Verbindung des Thiamins mit dem Na^+ -Ionen-Einstrom in der ersten Phase der Nervenenerregung

Voraussetzung 1:

Der Trägerstoff muß eng mit dem Na^+ -Transport verbunden sein. Ohne seine Anwesenheit darf ein Na^+ -Einstrom nicht erfolgen.

Die ersten Anzeichen dafür, daß Thiamin (I) im Zusammenhang mit der Nervenenerregung steht, wurden von Minz 1938 (36) gefunden. Er beobachtete, daß bei der Reizung an der Schnittfläche von Rindernerven Thiamin in vermehrtem Umfang freigesetzt wurde.

Durch Untersuchungen mit den Antimetaboliten Oxythiamin (II) und Neopyrithiamin (37-44) konnten die Funktionen des Thiamins im Körper weiter aufgeklärt werden. So treten nach Verabreichung von Oxythiamin bei den Versuchstieren Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit auf.



Der Codecarboxylase-Gehalt im Gewebe ist erniedrigt und demzufolge der Brenztraubensäuregehalt im Blut erhöht. Oxythiamin ist also ein typischer Antimetabolit der Codecarboxylase.

Im Gegensatz dazu ruft die Verabreichung von Neopyrithiamin (III) nervöse Störungen hervor. Der Gehalt an Codecarboxylase in Blut und Leber ist nahezu unverändert. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß das Thiamin im Nerven eine von seiner Eigenschaft als Vorstufe der Codecarboxylase abweichende Funktion ausüben müsse. Ausgehend von diesen Befunden wurden die Wirkung und Bedeutung des Thiamins bei der nervösen Reizleitung besonders von v. Muralt und seinen Mitarbeitern weiter aufgeklärt. Einige dieser Untersuchungen seien hier kurz

angeführt:

Bestimmte Rezeptoren auf der Froschzunge zeigen bei Berührung mit Wasser ein Aktionspotential, das man ableiten und messen kann. Behandelt man eine Froschzunge mit einem Extrakt aus dem Karpfendarm, der Thiaminasen enthält, so bleiben bei nachfolgender Reizung der Froschzunge die Aktionspotentiale aus (45). Dieser Effekt wird auf die Wirkung der thiamin-abbauenden Enzyme zurückgeführt.

Noch deutlicher wurden die Effekte bei der Untersuchung der Veränderung von Aktionspotentialen an einem isolierten Ranvierknoten (46,47). Wird hier das Thiamin von seinem Reaktionsort durch Neopyrithiamin verdrängt, so werden charakteristische Steilheitsänderungen des Aktionspotentials gefunden, die genau denen entsprechen, die durch Verminderung der Na^+ -Ionen-Konzentration auf der Außenseite des Nerven erhalten werden (48).

Da - wie erwähnt - die Steilheit des Aktionspotentials ein Maß für die einströmende Na^+ -Menge ist, zogen v. Muralt und seine Mitarbeiter den Schluß, daß Thiamin im Nerven mit der Aktivierung des Na^+ -Ionen-Transportsystems in direktem Zusammenhang steht (49).

Damit ist also die erste Voraussetzung, die man an einen Träger bei einer carrier-vermittelten Diffusion stellen muß, erfüllt.

2.3 Die Lokalisation des Thiamins im Nerv

Voraussetzung 2:

Der Träger muß in oder an der Nervenmembran vorkommen und durch die Membran hindurchtreten können.

Während aus zahlreichen Arbeiten hervorgeht, daß Thiamin im Nerven vorkommt und bei der Reizung in vermehrtem Umfang freigesetzt wird (36,50-52), gehen die Ansichten über die Lokalisation des Thiamins in der Nervenzelle selbst jedoch auseinander.

Am klarsten ist wohl der Befund von Nachmannsohn und Steinbach (53), die aus einer Riesennervenfaser des Tintenfisches das Axoplasma ausgequetscht haben. Sie fanden in dem verbleibenden Rest 2,5 mal mehr Thiamin als im Axoplasma. Mit diesen Ergebnissen stimmen die Befunde aus den Untersuchungen von v. Muralt (54,55) scheinbar überein, bei denen in Längsschnitten durch formalinfixierte Nerven das vorhandene Thiamin mit Kaliumferri-cyanid zu Thiochrom oxydiert wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war dann in der Markscheide eine stärkere Fluoreszenz aufzufinden als im Axoplasma.

In jüngster Zeit haben sich Chen und Liao (56) mit der Frage der Lokalisation von Thiamin im Nerven beschäftigt. Sie bedienten sich für die Herstellung ihrer Nervenlängsschnitte der Paraffin-Schnitt-Technik und fanden

den größten Fluoreszenzanteil im Axoplasma, den kleinsten in der Markscheide. Da ihre Ergebnisse denen v. Muralts zu widersprechen scheinen, setzen sie sich kritisch mit der Untersuchungsmethode v. Muralts auseinander:

Sie führen an, daß v. Muralt störende fluoreszierende Bestandteile der Markscheide vor der Untersuchung nicht ausgewaschen habe. Deshalb muß v. Muralt dort zuviel Fluoreszenz finden. Zum zweiten könne Kaliumferricyanid nach dieser Methode nur schwer ins Axoplasma gelangen, weshalb v. Muralt im Axoplasma weniger Thiamin finde als vorhanden sei.

Wenn dem so ist, so geben die Begründungen von Chen und Liao immer noch keinen Hinweis, weshalb Nachmansohn mit einer so vollkommen anderen Technik zum gleichen Ergebnis wie v. Muralt kommt.

Die drei Ergebnisse scheinen sich zunächst zu widersprechen. Doch stimmen sie unter der Annahme überein, daß das Thiamin in der Nervenmembran lokalisiert ist.

Dann nämlich muß Nachmansohn im Axoplasma weniger Thiamin finden als in dem verbleibenden Rest, der Scheide und Nervenmembran enthält.

Chen und Liao hingegen erkennen bei ihren Längsschnitten die Fluoreszenz des in der Membran enthaltenen Thiamins durch das darüberliegende Axoplasma hindurch und nehmen an, das Axoplasma fluoresziere selber.

Nimmt man an, daß bei den Untersuchungen v. Muralts aus den oben erwähnten Gründen in der Markscheide zuviel Fluoreszenz gefunden wurde, dann machen es die Ergebnisse von Nachmansohn und Steinbach und Chen und Liao wahrscheinlich, daß Thiamin vorzugsweise in der Nervenmembran lokalisiert sein muß.

Diese Annahme wird noch dadurch erhärtet, daß die von Chen und Liao beobachtete Thiamin-Fluoreszenz an den Ranvierschen - Knoten besonders intensiv ist.

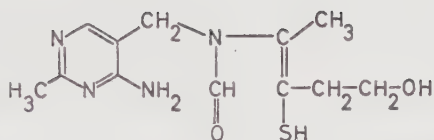
Am interessantesten ist aber zweifellos die Beobachtung von Chen und Liao, daß Thiamin die Nervenmembran an den Ranvierschen Knoten genau wie anorganische Ionen zu durchdringen vermag.

Damit erfüllt Thiamin auch den zweiten Punkt der Voraussetzungen, die ein Stoff haben muß, wenn er Carrier-Eigenschaften besitzen soll.

Aus den geschilderten Befunden ist nicht zu entnehmen, in welcher Form das Thiamin im Nerven vorkommt.

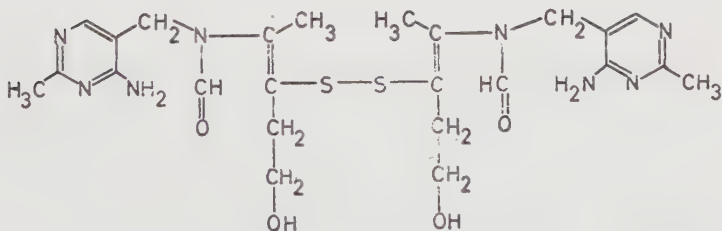
Aus den Untersuchungen von Gurtner (57,58) geht hervor, daß es in Form von Phosphorsäureestern auftritt, die bei der Thiochrom-Reaktion genau so reagieren wie freies Thiamin. Über diese Phosphorsäureester wird im nächsten Kapitel genaueres gesagt werden.

Die andere Frage ist, ob der Thiazolring in geschlossener Form vorliegt, oder ob er geöffnet und somit eine freie -S-H -Gruppierung entstanden ist:



Diese Frage kann im Moment noch nicht endgültig entschieden werden. Es liegen jedoch Befunde vor, die die offene Form begünstigt erscheinen lassen.

So konnten Bonvicino und Hennessy (59) nachweisen, daß Thiamindisulfid mit Proteinen sehr stabile Komplexe bildet.



Es wird angenommen, daß dabei eine Reaktion mit dem Cystein von Proteinen unter Ausbildung von -S-S- Brücken stattfindet.

Zum anderen wurde gefunden (60), daß die Anlagerung von Thiamin an Proteine langsamer vor sich geht als

die Anlagerung von Thiaminpropyldisulfid.

Die offene Form des Thiamins würde seine Trägereigenschaften in keiner Weise vermindern. Sie würde im Gegenteil die Anlagerung an die Proteine der Nervenmembran begünstigen.

2.4 Die Komplexe der Thiaminphosphorsäureester mit Na^+ - und K^+ -Ionen.

Voraussetzung 3:

Der Trägerstoff muß mit den zu transportierenden Ionen eine Bindung, wahrscheinlich komplexer Art eingehen können.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde bereits darauf hingewiesen, daß Thiamin im Nerv hauptsächlich mit Phosphorsäure verestert vorkommt. Da Polyphosphate als Komplexbildner für Alkali-Ionen bekannt sind, sollte geklärt werden, ob Thiamindiphosphat (TDP) oder Thiamintriposphat (TTP) mit Na^+ - bzw. K^+ -Ionen Komplexe zu bilden vermögen.

Zur Lösung dieses Problems^{*)} wurde das Verfahren der Analyse von pH-Titrationskurven angewendet (61,62);

*) Für die experimentelle Hilfe bei der Bearbeitung dieses Problems danke ich Herrn Dr. H. Hoffmann.

Melchior (63) konnte damit die Komplexbildung von ATP und ADP mit Na^+ - und K^+ -Ionen nachweisen.

TDP bzw. TTP wurden einmal in Gegenwart von Tetramethylammoniumchlorid, zum anderen bei Anwesenheit von NaCl bzw. KCl mit Tetramethylammoniumhydroxyd titriert, wobei die Ionenstärke und die Metallionenkonzentration konstant gehalten wurde.

In der Abb. 2 sind die so erhaltenen Titrationskurven dargestellt.

Aus dem unterschiedlichen Verlauf der dargestellten Titrationskurven geht hervor, daß sowohl TDP als auch TTP im pH-Bereich über 5 mit Na^+ - und K^+ -Ionen Komplexe bilden. Die Neutralisationskurven II zeigen, daß die Stabilität der Natrium- und der Kalium-Komplexe praktisch gleich ist. Darüberhinaus ist aus den Komplexbildungskonstanten (vgl. Tab. 2) zu entnehmen, daß die Komplexe des TTP im Vergleich zu den entsprechenden Komplexen des TDP wesentlich stabiler sind.

Zur Berechnung der Komplexbildungskonstanten ist die Kenntnis der Säuredissoziationskonstanten der Phosphorsäureester erforderlich. Sie wurden nach dem von Schwarzenbach (61) angegebenen grafischen Verfahren für die zweite und dritte Dissoziationsstufe des TDP mit $K_{S2} = 9,2 \cdot 10^{-6}$ und $K_{S3} = 2,7 \cdot 10^{-7}$ sowie für die 3. und 4. Dissoziationsstufe des TTP mit $K_{S3} = 6 \cdot 10^{-7}$ und $K_{S4} = 4 \cdot 10^{-9}$ bestimmt. Da drei Dissoziationsgebiete

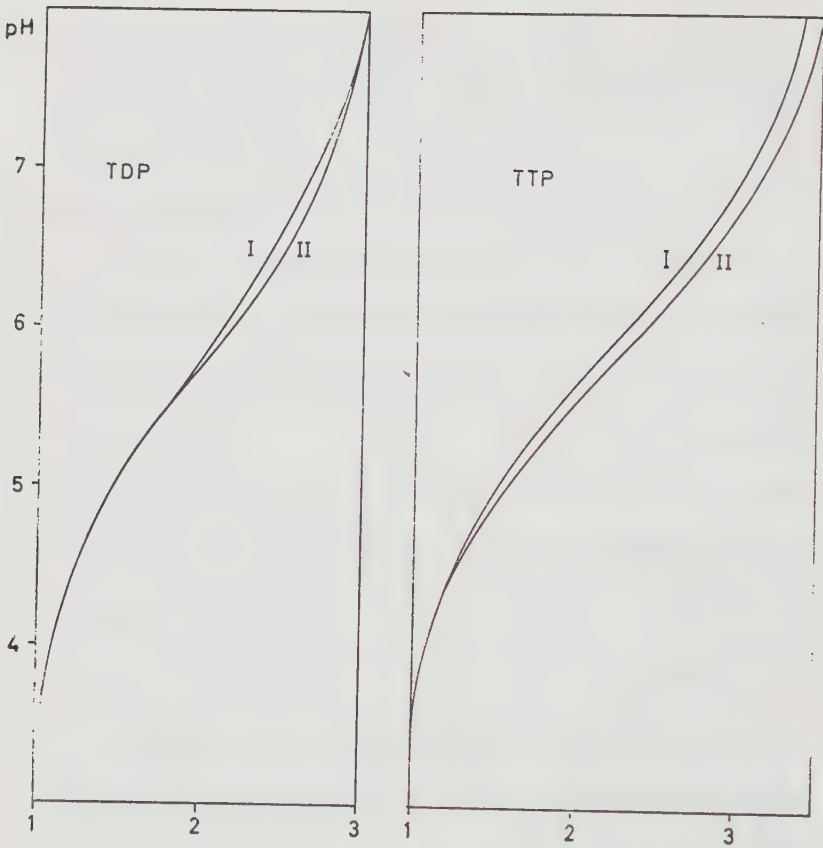


Abb. 2 Neutralisationskurven von TDP bzw. TTP in Gegenwart von 0,2 m $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ bzw. Alkali-Ionen. Abszisse = Mole Base pro Mol ursprünglich vorhandenem TDP bzw. TTP. Titration in Gegenwart von $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ (I) bzw. NaCl oder KCl (II) Titrationmittel $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$.

des TTP sehr nahe beieinander liegen und bereits vor der vollständigen Dissoziation des 4. Protons die Zersetzung des Thiamins beginnt (64), sind die für TTP angegebenen Werte mit erheblichen Fehlern belastet und können nur als orientierende Größen betrachtet werden.

Tabelle 2

Komplexbildungsreaktion des Na^+ (bzw. K^+) mit TDP und TTP und die zugehörigen Komplexbildungskonstanten:

Reaktion	K
$\text{Na}^+ + \text{TDP}^{3-} \rightleftharpoons \text{NaTDP}^{2-}$	$1,5 \pm 0,3$
$\text{Na}^+ + \text{HTTP}^{3-} \rightleftharpoons \text{NaHTTP}^{2-}$	2
$\text{Na}^+ + \text{TTP}^{4-} \rightleftharpoons \text{NaTTP}^{3-}$	15

Damit erfüllen sowohl TDP als auch TTP die 3. an einen Trägerstoff zu stellende Voraussetzung. Da aber TTP wesentlich stabilere Komplexe mit Na^+ - Ionen bildet als TDP, ist anzunehmen, daß insbesondere TTP als Trägerstoff für Na^+ - Ionen in der ersten Phase der Nervenenerregung in Frage kommt.

2.5 Die verschiedenen Phosphorylierungsstufen des Thiamins im Nerv

Voraussetzung 4:

Der Carrier muß in mindestens zwei Zuständen auftreten, nämlich in einem Ruhezustand und in einem Aktionszustand.

Die verschiedenen Phosphorylierungsstufen des Thiamins im Nerv und deren Umwandlung bei der Reizung wurden bereits von Gurtner (57,58) untersucht. Er hat zunächst die in einem ruhenden Nerv vorkommenden Thiaminphosphorsäureester nach dem Einschießen in flüssiges Propan bestimmt. Dabei wurde hauptsächlich TDP, etwas TTP, wenig Thiaminmonophosphat (TMP) und fast kein Thiamin nachgewiesen. Wurde nach intensiver Reizung des Nerven dessen Thiaminphosphorsäureester-Gehalt mit der gleichen Methode bestimmt, so wurde gar kein TTP, nur noch wenig TDP, sehr viel TMP und etwas Thiamin gefunden. Demnach tritt bei der Reizung eine Entphosphorylierung der Thiaminphosphorsäureester auf.

In histochemischen Untersuchungen ist es gelungen, an der Nervenmembran Phosphatasen nachzuweisen (65-67), die eventuell diese Entphosphorylierungen katalysieren können.

Es erhebt sich somit die Frage, ob im Nerv Enzyme vorhanden sind, die umgekehrt die Bildung höher phosphorylierter Thiaminphosphorsäureester aus dem entstandenen Thiamin bzw. TMP oder TDP zu katalysieren imstande sind.

Gurtner ist dieser Frage nachgegangen (58), hat aber solche Enzyme nicht nachweisen können.

Bei der Durchführung ähnlicher Versuche mit dem Gesamthomogenat des Nervus ischiadicus vom Frosch und Hirn vom Rind als Enzymquelle fanden wir ebenfalls nur hohe Phosphatase-Aktivitäten. Es wurde deshalb versucht, den Teil der Phosphatasen, der in den Mitochondrien lokalisiert ist, durch Zentrifugieren abzutrennen.

Es wurde davon ausgegangen, daß ein Enzym, das am Na^+ - Ionen-Transport beteiligt sein soll, in oder an der Nervenmembran lokalisiert sein muß. Die Membran zerfällt beim Homogenisieren in Bruchstücke, die sich im $15\ 000 \times g$ - Überstand elektronenmikroskopisch nachweisen lassen (68).

In einer auf ähnliche Weise hergestellten Zellfraktion fand Skou (29,30) eine ATPase, der er eine bestimmte protein-phosphorylierende Eigenschaft zuschreibt und die im aktiven Ruhetransport des Nerven eine Rolle spielen soll.

Als Ausgangsmaterial für die Enzympräparation diente das Rückenmark vom Schwein, ein Nervengewebe, das in großen Mengen leicht zu beschaffen ist, das markhaltige

Nervenfasern enthält und in dem die Reizleitung ebenfalls saltatorisch erfolgt (61).

Daraus wurde nach dem Homogenisieren ein 15 000 x g - Überstand hergestellt und davon in üblicher Weise ein Acetontrockenpulver bereitet.

Bei der Inkubation des Acetontrockenpulvers mit ATP als Phosphatdonor und Thiamin bzw. TMP oder TDP als Phosphataktzeptoren zeigte sich zunächst wieder eine sehr hohe Phosphatase-Aktivität. Durch starke Erhöhung der ATP- Konzentrationen konnte ein Abbau von bereits synthetisierten Thiaminphosphorsäureestern verhindert und somit Phosphorylierungen nachgewiesen werden.

Eine teilweise Abtrennung der Phosphatasen gelang auch durch einstündiges Rühren des Aceton-Trockenpulvers in Pufferlösung bei $+2^{\circ}$ und anschließendes Zentrifugieren. Der dabei erhaltene Niederschlag enthielt hauptsächlich Phosphatasen, während mit dem Überstand eine Synthese von TTP besser als mit dem Gesamt-Trockenpulver nachgewiesen werden konnte.

Als Blindversuch für jede Reaktion diente jeweils ein gleicher Ansatz, der sofort eingefroren und erst unmittelbar vor dem Auftragen auf die Elektrophorese wieder aufgetaut wurde. Bei diesen Blindwerten ließ sich in keinem Fall ein gegenüber dem jeweils eingesetzten Substrat höher phosphorylierter Ester nachweisen. Die normalerweise als Blindversuch übliche Inkubation ohne ATP konnte als Vergleichsversuch nicht herangezogen

gen werden, da bei solchen Ansätzen durch die hohe Phosphatase-Aktivität während der Inkubation ein zu starker Abbau der als Substrate eingesetzten Thiaminphosphate erfolgte.

Nach der Inkubation wurden die Produkte papierelektrophoretisch getrennt. Durch Überführung in die entsprechenden Thiochromderivate konnten sie unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und durch Vergleich mit authentischen Proben identifiziert werden (vgl. Abb. 3).

Wie die Abbildung zeigt, tritt bei Einsatz von vorher besonders gereinigtem TDP als Phosphatakzeptor stets TTP als Phosphorylierungsprodukt auf. Daraus ist zu schließen, daß in der beschriebenen Zellfraktion des Nervengewebes wahrscheinlich eine ATP:TDP-Phosphotransferase vorhanden ist, die folgende Reaktion katalysiert:



Wurde in dem beschriebenen Inkubationsansatz Thiamin als Phosphatakzeptor verwendet, so trat stets eine Phosphorylierung zu TMP auf. Dagegen gelang es trotz vielfältiger Variation der Versuchsbedingungen nicht, mit dem verwandten Enzympräparat eine Synthese von TDP nachzuweisen, wenn Thiamin oder TMP oder ein Gemisch beider Stoffe als Phosphatakzeptoren eingesetzt wurden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß andere Zellfraktionen des Nervengewebes die Synthese von TDP aus

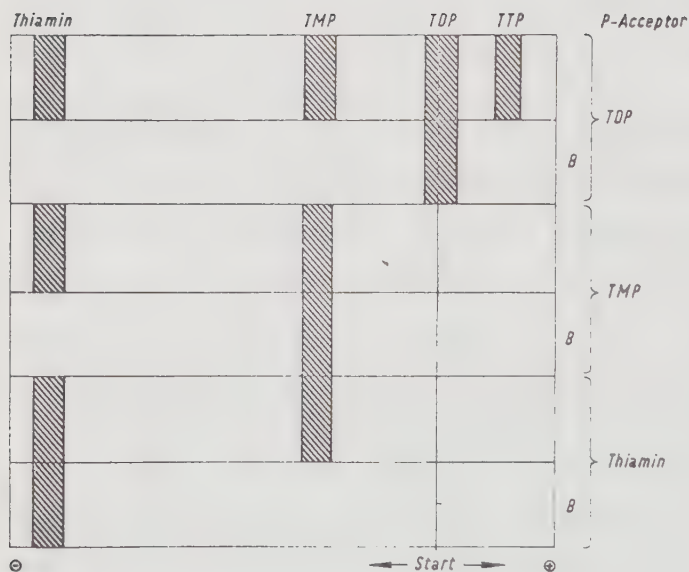


Abb. 3 Hochspannungselektrophoretische Trennung der Inkubationsansätze. B = Blindversuche

TMP oder Thiamin zu katalysieren vermögen.

Diese Befunde geben einen Hinweis auf die Spezifität der beobachteten Enzym-Aktivitäten. Wäre nämlich die Synthese von TTP und TMP auf Grund der Wirkung unspezifischer Phosphotransferasen erfolgt, so sollte man auch eine Bildung von TDP erwarten.

Es erhebt sich nun weiterhin die Frage, ob diese Phosphorylierungen etwa auf die Wirkung von Phosphatasen zurückzuführen sind. Grundsätzlich kann man eine Phosphatase-Reaktion als Transphosphorylierung ansehen, bei der Wasser als Phosphatakzeptor fungiert.

Übertragen auf die beobachteten Phosphorylierungen würde das bedeuten, daß TDP das Wasser als Phosphatakzeptor verdrängt. Die Konzentration des Wassers im Versuchsan-satz ist aber $5,5 \cdot 10^1$ m, die des TDP $2 \cdot 10^{-3}$ m. Das bedeutet, daß die Affinität des TDP zum Enzym etwa $2,5 \cdot 10^4$ mal größer ist als die des Wassers zum Enzym. Daraus geht hervor, wie spezifisch das Enzym für TDP ist.

Abschließend ist zu den hier geschilderten Untersuchungen zu sagen, daß daraus das Vorkommen des Thiamins im Nerven in mehreren Zuständen zu entnehmen ist. Die einzelnen Phosphorylierungsstufen, die möglicherweise Aktionsform und Ruheform darstellen, können durch Enzyme, die im Nerv vorkommen, ineinander übergeführt werden.

Damit erfüllt TTP alle Voraussetzungen, die an einen Träger für die carrier-vermittelte Diffusion des Ionen-Transports in der ersten Phase der Nerven-erregung zu stellen sind.

2,6 Zum Problem des biochemischen Mechanismus der Nerven- erregung

Nach dem Gesagten kann man sich den Mechanismus der Nerven-erregung hypothetisch etwa folgendermaßen vorstellen:

Der vom benachbarten Ranvierschen Knoten ankommende Reiz bewirkt, daß TTP entweder aus einem Speicher freigesetzt oder durch Phosphorylierung aus TDP schnell gebildet wird. Das TTP kann als Carrier fungieren, indem es auf der Außenseite der Membran mit Na^+ - Ionen einen Komplex bildet und infolge des Konzentrationsgefälles durch die Membran hindurch in das Innere des Nerven wandert. Es resultiert daraus der steile Anstieg des Aktionspotentials.

Auf der Innenseite des Nerven werden infolge der wesentlich höheren K^+ - Ionen-Konzentrationen die Na^+ - Ionen abgegeben und dafür K^+ - Ionen aufgenommen. Gleichzeitig kann es zu einer Entphosphorylierung kommen. Das entstehende TDP kann dann mit K^+ - Ionen beladen nach außen wandern und dort seine K^+ - Ionen abgeben. Dies entspricht

dem langsameren K^+ - Ionenausstrom in der zweiten Phase der Nervenenerregung.

Diese Hypothese wird durch folgende Befunde gestützt:

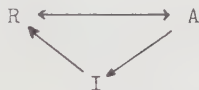
- 1.) TTP ist in verschiedenen nervösen Organen (Gehirn, Nerven) nachgewiesen worden (57,58,70-72) und man weiß auch, daß sich die pharmakologischen Wirkungen von TTP und TDP unterscheiden. So zeigt z.B. TTP eine wesentlich intensivere Wirkung beim nervösen Herzflimmern als TDP (73). Trotzdem ist über die physiologische Rolle des TTP bisher nichts bekannt geworden. Die Beteiligung des TTP an einem Transportmechanismus wäre eine mögliche physiologische Funktion.
- 2.) Auch die Befunde von Bashlykov und Markin (74) deuten auf eine solche Funktion des Thiamins hin. Sie fanden, daß die Geschwindigkeit der Reizleitung im Nerv-Muskel-Präparat durch Thiamin erhöht wird.
- 3.) Ebenso konnten De Caro, Ferrari und De Caro zeigen, daß Thiamin im Rattennerv als Katalysator für die Reizleitung anzusehen ist (75).
- 4.) Gerard (76,77) fand, daß bei der Nervenenerregung energiereiche Phosphate wie ATP und Kreatin-Phosphat gespalten werden. Die dabei auftretenden Spaltprodukte ADP und Kreatin werden in Mitochondrien wieder phosphoryliert (78,79). Eine Anhäufung von Mitochondrien

ist von Gasser (80) und Robertson (81) in der Nähe der Membran der Ranvierschen Knoten elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden.

- 5.) Es ist leicht einzusehen, daß die beobachtete Spaltung ein Teil einer Transphosphorylierungsreaktion darstellen kann. Solche Transphosphorylierungen sind von Ahmed, Judah und Wallgren (82) an Rattenhirn-Rindenschnitten beobachtet worden. Sie fanden eine Erhöhung des Einbaus von radioaktivem Phosphat nach elektrischer Reizung der Schnitte.
- 6.) Auch die hypothetisch geforderte Entphosphorylierung des TTP auf der Innenseite des Nerven kann durch Experimentalbefunde gestützt werden:
Neben den bereits erwähnten Ergebnissen von Gurtner (57,58), Libet (65), Rothstein (66) und Mölbert (67) verdienen die von Pinner, Davison und Campbell (83) erhobenen Befunde besondere Beachtung. Sie konnten erstmals nachweisen, daß in Nerven von Katzen, Ratten und Menschen Phosphatasen besonders an den Ranvierschen Knoten gehäuft auftreten.
Roskin und Teodorescu (84) fanden weiterhin, daß die Aktivität dieser Phosphatasen vom Gehalt des Nerven an Thiamin abhängt. Bei Hypovitaminose war die Aktivität dieser Enzyme erniedrigt, bei Hypervitaminose erhöht.
- 7.) Vergleicht man in der Abbildung 2 die bei physiologi-

schem pH durch TTP eintransportierbare Na - Ionenmenge mit der durch TDP austransportierbaren K -Ionenmenge, so findet man ein Verhältnis von 4:3. Das gleiche Verhältnis wurde von Keynes (25) bei der Erregung des Nerven auch experimentell gefunden.

Weidmann (85) hat den einzelnen Phasen des Aktionspotentials verschiedene Zustandsformen des Carriers zugeordnet. Nach dieser Hypothese wird in der ersten Phase der Nerven-erregung aus der Ruheform des Trägers R die aktive Form A gebildet, die den Na-Ionen-Einstrom ermöglicht. Im weiteren Verlauf der Erregung wird dieser aktive Carrier in eine in-aktive Form I umgewandelt, die in der sogenannten " relativen Refraktärphase" wieder in die Ruheform überführt wird. Schematisch dargestellt ergibt sich folgendes Bild:



Will man die verschiedenen Thiaminphosphorsäureester in dieses Schema einfügen, so ergeben sich zwei Möglichkeiten:

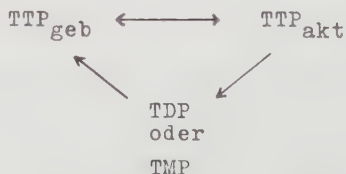
1.) Die Ruheform des Trägers ist TDP, das eventuell auch an ein Speicherprotein oder Ca^{2+} -Ionen gebunden vorliegen kann. Durch den ankommenden Impuls kann die durch die be-

beschriebene ATP : TDP-Phosphotransferase katalysierte Bildung von TTP ausgelöst werden. TTP würde dann als aktiver Träger wirken und auf der Innenseite der Membran



zu dem inaktiven Carrier TMP entphosphoryliert werden. Durch einen möglicherweise in den Mitochondrien ablaufenden Phosphorylierungsschritt könnte TDP zurückgebildet werden.

2.) Die Ruheform ist ein an ein Speicherprotein oder Ca^{2+} -Ionen gebundenes TTP, das durch den ankommenden Impuls in eine aktive Form überführt wird und Na^{+} -Ionen durch die Membran transportiert. Das aktive TTP kann durch Phosphatasen auf der Innenseite der Membran in für den Na^{+} -Transport nach außen ungeeignetes TMP oder TDP überführt werden,



die somit die inaktive Form des Carriers darstellen würden. Durch die beschriebene ATP:TDP-Phosphotransferase-Aktivität wäre deren Überführung in die Ruheform möglich. Beim Anfall von TMP müßte dabei eventuell ein Phosphory-

lierungsschritt in den Mitochondrien zwischengeschaltet sein.

Eine Entscheidung, welche der beiden Zuordnungen sinnvoll ist, kann im Moment noch nicht getroffen werden. Die beiden Möglichkeiten sollen lediglich als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen verwendet werden.

3.1. Diskussion der bisher vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika

In älteren Arbeiten wurde meistens versucht, die Wirkung der Lokalanaesthetika auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften zurückzuführen. So wurde beispielsweise die Frage untersucht, ob Lokalanaesthetika ihre Wirkung ähnlich wie die Narkotika nach der von Meyer und Overton aufgestellten Lipoid-Theorie allein durch ihre Anreicherung im Nerven entfalten können (86-88).

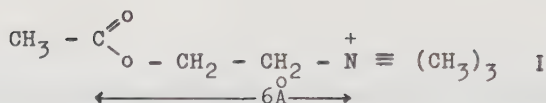
Beim Vergleich der Verteilungskoeffizienten der Lokalanaesthetika mit ihrer pharmakologischen Wirksamkeit findet man zwar innerhalb von homologen Reihen oft Übereinstimmungen; beim Vergleich unterschiedlich gebauter Verbindungen - ja schon bei Stellungsisomeren - ergeben sich jedoch abweichende Resultate (89).

Daraus ist zu schließen, daß der Verteilungskoeffizient die Wirksamkeit eines Lokalanaesthetikums zwar beeinflußt, aber nicht alleine dafür verantwortlich zu machen ist. Der Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika ist sicherlich wesentlich komplexer.

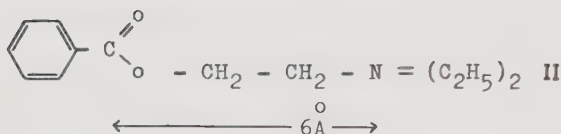
Inzwischen sind eine ganze Reihe von neuen Theorien zum Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika aufgestellt

worden, die häufig Widersprüche hervorgerufen haben. Eine zusammenfassende Übersicht wurde von Watson (90) gegeben.

Am häufigsten wurde in letzter Zeit eine von Thimann entwickelte Acetylcholin-Verdrängungstheorie als möglicher Wirkungsmechanismus diskutiert (91). Diese Theorie geht von der von Nachmansohn aufgestellten Hypothese aus, daß Acetylcholin auch bei der axonalen Reizleitung im Nerven die Rolle einer Aktionssubstanz spielt. Das aus einem Speicher freigesetzte Acetylcholin soll sich mit einem spezifischen Rezeptor in der Nervenmembran verbinden, dadurch soll die Struktur der Membran verändert und diese selbst für Na^+ -Ionen durchlässig werden. Die Lokalanaesthetika sollen dann ihre Wirkung in der Weise entfalten, daß sie sich an Stelle des Acetylcholins mit dem Rezeptor verbinden und dadurch den beschriebenen physiologischen Reaktionsablauf stören. Die strukturelle Ähnlichkeit des Acetylcholins (I) mit dem Grundbaustein vieler Lokalanaesthetika, dem Benzoessäurediaethylaminoäthylester (II), schien zunächst eine Stütze für die eventuelle Richtigkeit dieser Theorie zu sein.



Acetylcholin



Benzoessäurediaethylaminoätylester.

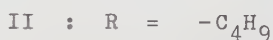
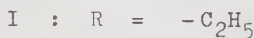
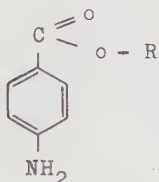
Tatsächlich ergaben aber eine Reihe von Untersuchungen über die Wirkung des Acetylcholins, daß ihm zwar bei der Übertragung von Impulsen an der motorischen Endplatte oder an einer Synapse zweifellos eine Transmitter-Funktion zukommt, daß es aber bei der axonalen Reizleitung nicht die ihm von Nachmansohn zugedachte Rolle spielen kann (92-94).

So wurde zum Beispiel nach Mikroinjektion von hohen Dosen Acetylcholin in das Axoplasma des Nerven ein Block, nie aber eine Erregung beobachtet (95).

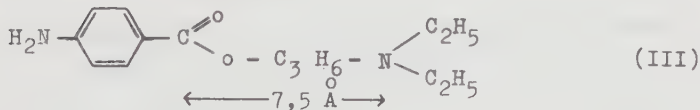
Ehrenpreis hat vor kurzem einen Überblick über den derzeitigen Stand der Forschung über die Rolle des Acetylcholins bei der axonalen Reizleitung gegeben (96). Er kommt zu dem Schluß, daß der Na^+ -Ionen-Einstrom in der ersten Phase der Nervenenerregung über eine noch unbekannte Substanz erfolgen müsse. Die Wirkung der verschiedenartigsten Verbindungen auf

die Nervenenerregung werde durch eine Reaktion mit einem Bestandteil der Membran hervorgerufen, der mit dem Acetylcholinrezeptor der Synapsen keine Ähnlichkeit habe.

Nach der Acetylcholin-Verdrängungstheorie ist auch nicht zu erwarten, daß das Anaesthesin^R (I) oder das Butesin^R (II) wirksame Lokalanaesthetika sind, da sie keine aliphatische Aminogruppe enthalten.

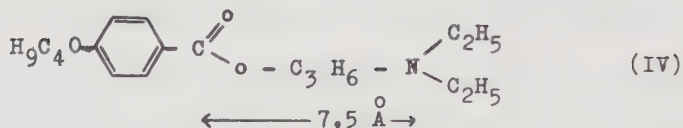


Durch Verlängerung der Kohlenstoffkette zwischen dem Carbonyl-C und dem aliphatischen Stickstoff sollte man nach der oben angeführten Theorie einen Wirkungsabfall erwarten. In Wirklichkeit ist aber das Propylhomologe des Procains (III) 25-30% besser wirksam als das Procain selbst (97).



Die gleichen Verhältnisse wurden bei den Propylhomologen des Stadacains^R (IV) und anderer Alkoxybenzoesäuren auf-

gefunden (98,99)



Eine Theorie des Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika muß zunächst die neueren elektrophysiologischen Erkenntnisse berücksichtigen, die wir heute über die Wirkung der Lokalanaesthetika besitzen. Nach den Untersuchungen von Hardt und Fleckenstein (100), Shanes (101) und Weidmann (102) kommt es nach einer Applikation von Lokalanaesthetika an einen Nerven zu einer Membranstabilisierung; das heißt, ankommende Erregungswellen können keine Membranpotentialveränderung mehr hervorrufen.

Dieser Effekt läßt sich nach Fleckenstein (103 , 104), Straub (105), Shanes, Freygang, Grundfest und Amatniek (106) sowie Inoue und Frank (107) durch eine Verminderung der Na^+ -Ionen-Permeabilität der Nervenmembran in der ersten Erregungsphase erklären. Eine solche Wirkung kann einmal durch Blockierung des Carriers selbst, zum anderen aber auch durch Hemmung der Bildung des aktiven Carriers oder seiner Freisetzung aus einer Ruheform hervorgerufen werden.

Bei der Überlegung, welcher Art die Beeinflussung des Carriers durch das Lokalanaesthetikum sein kann, muß man in Betracht ziehen, daß sehr viele konstitutionell vonein-

ander abweichende Stoffgruppen lokalanaesthetische Eigenschaften aufweisen. So besitzen neben den eigentlichen Lokalanaesthetika auch Spasmolytika vom Typ der Phenyl-essigsäure-Derivate, Phenothiazine, Antihistaminika und viele andere lokalanaesthetische Eigenschaften.

Allen diesen Verbindungen ist jedoch gemeinsam, daß sie ein aromatisches System besitzen, das über eine Kohlenstoffkette mit einem aliphatischen Stickstoff verbunden ist. Der aliphatische Stickstoff scheint für die Wirkung nicht direkt erforderlich zu sein. Offenbar dient er nur dazu, das Lokalanaesthetikum als Salz in eine geeignete wasserlösliche Transportform zu überführen.

Aus der relativ geringen Konstitutionsspezifität der lokalanaesthetisch wirksamen Substanzen muß geschlossen werden, daß der Mechanismus der Beeinflussung von Carrier-Funktion oder Carrier-Bildung durch Lokalanaesthetika auf eine Wechselwirkung sehr allgemeiner Art zurückzuführen sein muß.

3.2. Komplexe der Lokalanaesthetika mit Thiamin

Eine Reaktion, die von allen oben angeführten Stoffen eingegangen werden kann, ist zum Beispiel eine Komplexbildung. Eine solche Wechselbeziehung zwischen Lokalanaesthetika und Thiamin wurde von Eckert (108) nachgewiesen. Bei der spektrophotometrischen Untersuchung von Lösungen, die

Lokalanaesthetika und Thiamin enthielten, treten Veränderungen der Spektren gegenüber denen der reinen Lokalanaesthetika-Lösungen auf.

Zur Erhärtung dieser Ergebnisse und um annähernd quantitative Aussagen über die Komplexstabilität machen zu können, wurde die Komplexbildung von Lokalanaesthetika mit Thiamin mit Hilfe einer anderen Methode untersucht.

Die angewendete Solubilisationsmethode beruht im Prinzip auf folgender Überlegung: `

Schüttelt man den schwerlöslichen Stoff A in einem inerten Lösungsmittel, so wird davon soviel in Lösung gehen, bis in der Lösung eine ganz bestimmte, für den Stoff charakteristische Konzentration erreicht ist.

Schüttelt man aber den gleichen Stoff in einer Lösung des Stoffes B, der in der Lage ist, mit dem Stoff A einen löslichen Komplex zu bilden, so wird sich soviel von A mehr lösen, wie in dem AB-Komplex an A enthalten ist.

Die Komplexbildungskonstante für einen 1:1-Komplex

$$K = \frac{[A \ B]}{[A] \cdot [B]}$$

kann auf Grund folgender Überlegung ermittelt werden:

Die Konzentration an Komplex $[AB]$ ergibt sich nach dem oben gesagten als Differenz der Konzentrationen des Stoffes A in den Solubilisationsansätzen mit und ohne Zusatz des Stoffes B :

$$[AB] = [A_B] - [A_o]$$

(wobei $[A_B]$ = Konzentration des Stoffes A bei Anwesenheit von B,

$[A_o]$ = Konzentration des Stoffes A im reinen Lösungsmittel)

Die Konzentration $[A]$ des im Komplexeleichgewicht frei vorliegenden Stoffes A ist gleich der Konzentration des Stoffes A im Solubilisationsansatz ohne B:

$$[A] = [A_o]$$

Die Konzentration $[B]$ des im Komplexeleichgewicht frei vorliegenden Stoffes B ist gleich der ursprünglich vorhandenen Konzentration an B $[B_o]$, vermindert um den Teil, der als Komplex vorliegt.

$$[B] = [B_o] - [AB] = [B_o] - ([A_B] - [A_o])$$

Daraus ergibt sich:

$$K = \frac{[A_B] - [A_o]}{[A_o] ([B_o] - [A_B] + [A_o])}$$

Zur Durchführung der Versuche wurde jeweils ein Überschuß der in Tabelle 3 aufgeführten Verbindungen mit $0, 2 \cdot 10^{-2} \text{ m}$, $4 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ und $6 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ Thiaminmononitrat bis zur Einstellung

des Lösungs- und Komplexgleichgewichtes geschüttelt. Nach Beendigung des Schüttelns wurde die Konzentration der in jedem Ansatz in Lösung gegangenen Stoffe spektrophotometrisch nach starker Verdünnung bestimmt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kurven zusammengefaßt (vgl. Abb. 4-6). Es zeigt sich in allen untersuchten Fällen ein Kurvenanstieg, der auf eine Komplexbildung schließen läßt. Aus dem Kurvenverlauf kann man nach dem oben angegebenen Verfahren die Komplexbildungskonstanten der Lokalanaesthetika mit Thiamin angenähert bestimmen, wenn man für A das betreffende Lokalanaesthetikum und für B Thiaminmononitrat einsetzt.

Die ermittelten Komplexbildungskonstanten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (vgl. Tabelle 3).

Erläuterungen zu den Abbildungen 4 - 6 :

Darstellung der Ergebnisse der Solubilisationsversuche

- A = Löslichkeit der Stoffe der Tabelle 3 in Mol/l
TMN = Konzentration an Thiaminmononitrat im Solubili-
sationsversuch in Mol/l

Abbildung 4:

- I = Chinchocain
II = Benzocain
III = Benzoessäureäthylester
IV = Chlorpromazin

Abbildung 5:

- I = Stadacain^R
II = Nipagin^R
III = Tetracain
IV = Chlormethylacetanilid

Abbildung 6:

- I = Procain
II = Hostacain^R
III = Cocain

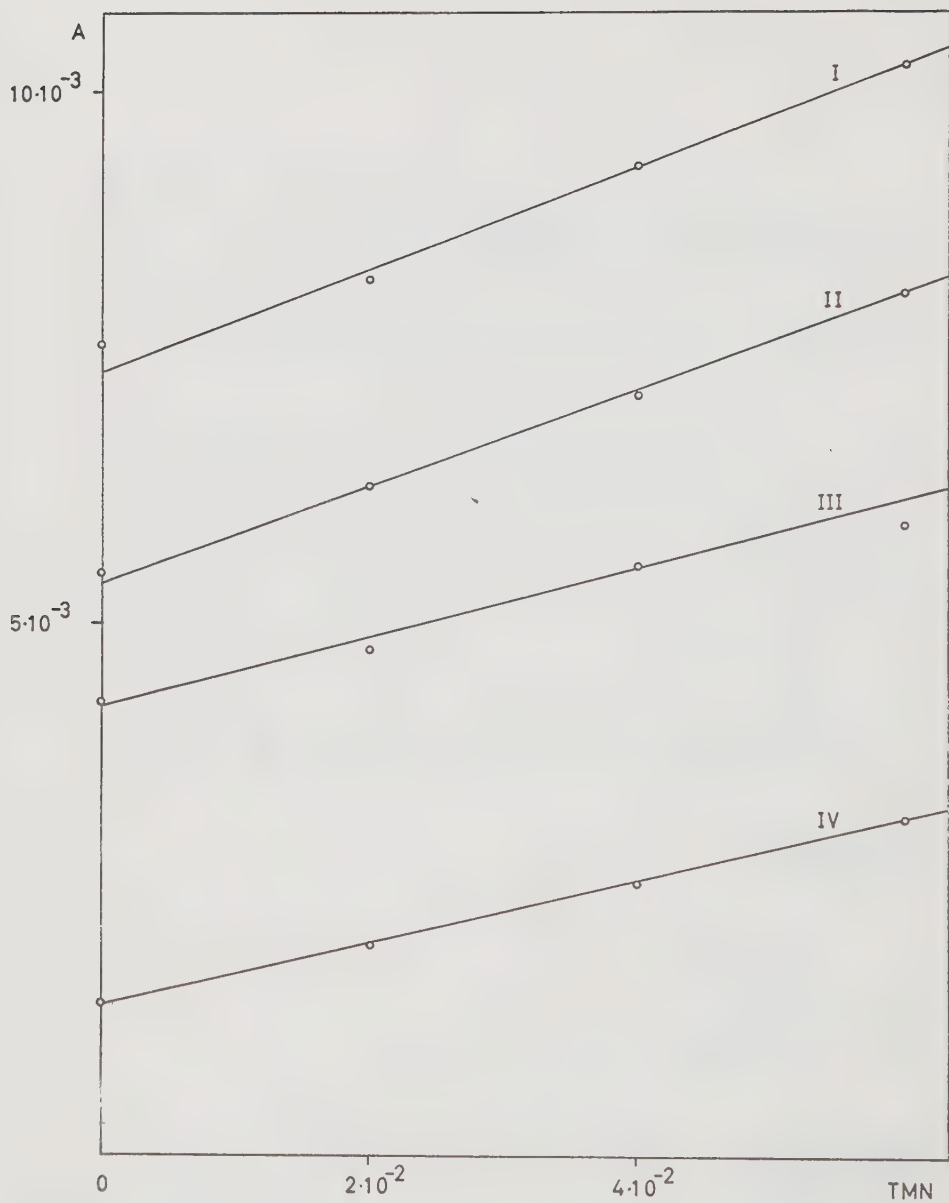


Abb. 4

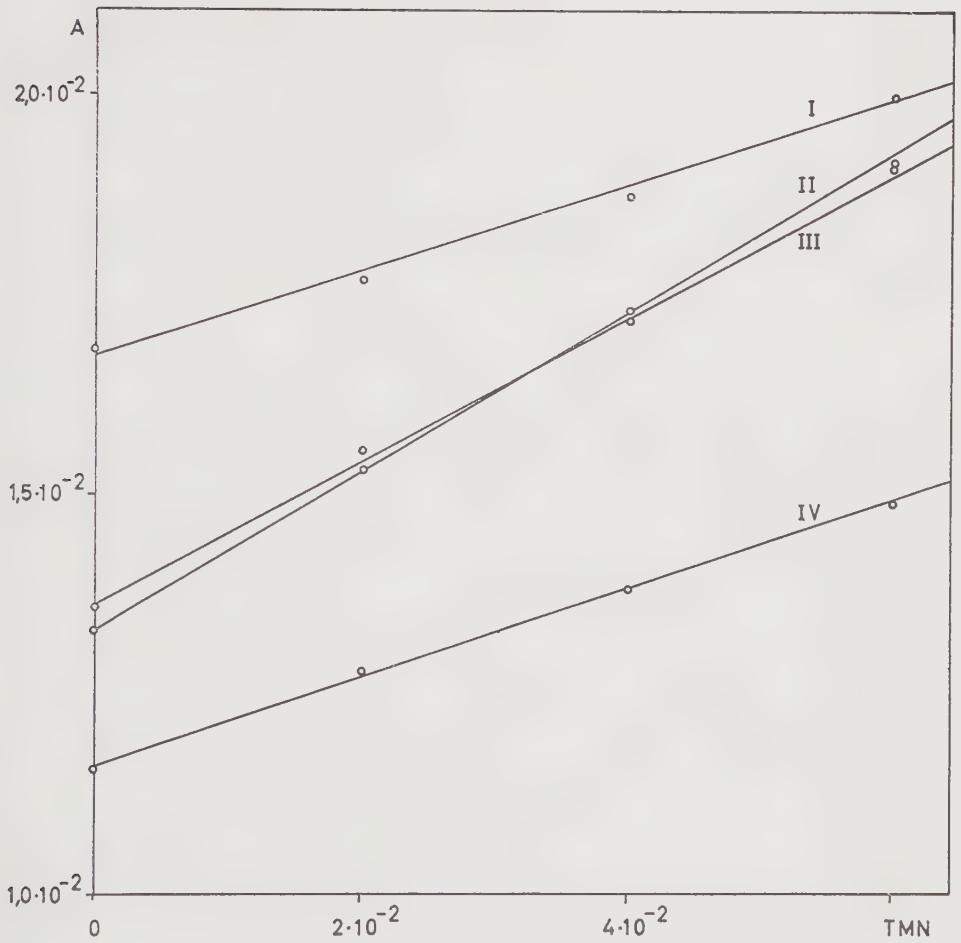


Abb. 5

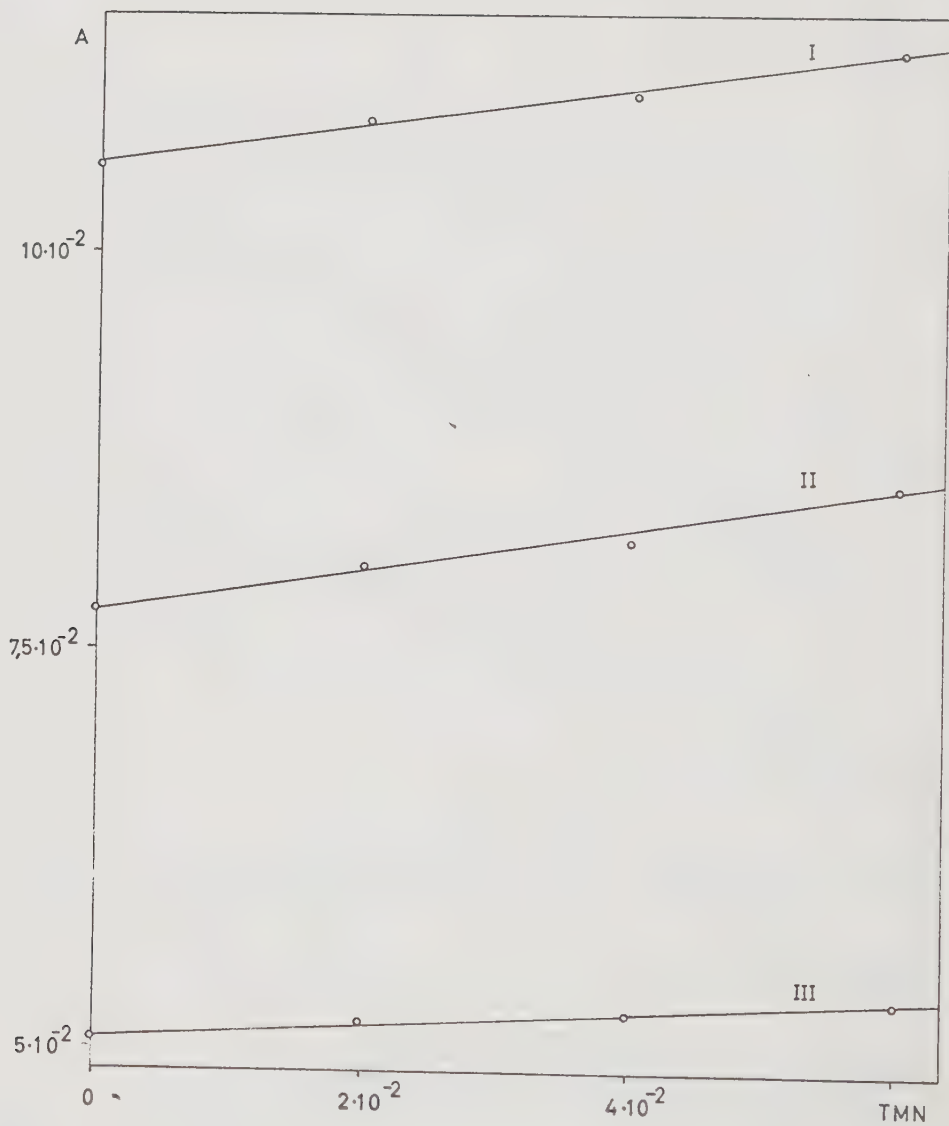
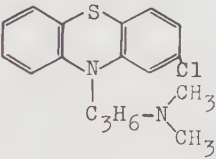
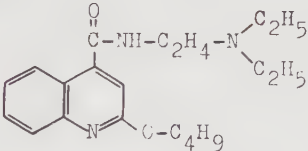
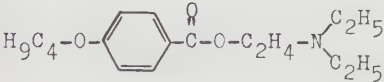
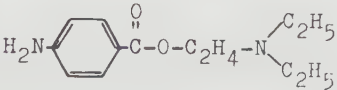
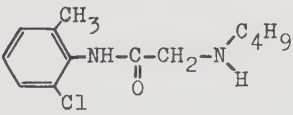
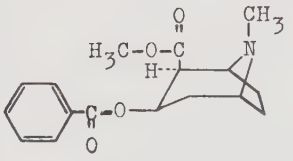
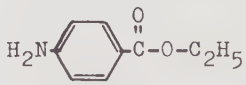
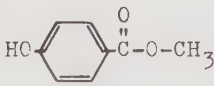
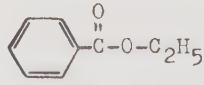
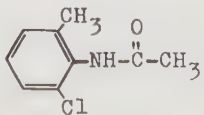


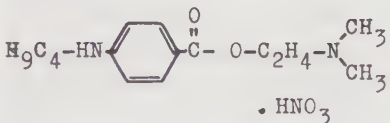
Abb. 6

Tabelle 3:

Zusammenstellung der mit Hilfe der Solubilisationsmethode untersuchten Verbindungen und der gefundenen Komplexbildungskonstanten

Nr.	Formel	Name	K
Gruppe A: Verbindungen mit aliphatischer Aminogruppe			
1		Chlorpromazin	20,4
2		Cinchocain	7,1
3		Stadacain ^R	3,4
4		Procain	3,0

5		Hostacain ^R	2,0
6		Cocain	1,6
Gruppe B: Verbindungen ohne aliphatische Aminogruppe			
1		Benzocain	9,0
2		Nipagin ^R	8,1
3		Benzoessäureäthyl- ester	7,1
4		2-Chlor-6-methyl- acetanilid	5,4

Gruppe C : Schwerlösliches Salz			
1	 <chem>CN(C)CCOC(=O)c1ccc(NC4CCCC4)cc1.[O-][N+](=O)[O-]</chem>	Tetracainnitrat	8,1

Am auffälligsten in der Gruppe A ist die Erscheinung, daß durch Vergrößerung des aromatischen Systems die Komplexbildung wesentlich begünstigt wird. So zeigen die Verbindungen mit nur einem Benzolring eine durchschnittliche Komplexbildungskonstante von etwa 2,5 , die je nach der Art des Substituenten um etwa 1,0 nach oben oder unten abweicht. Beim Cinchocain, das mit seinem Chinolinring ein kondensiertes aromatisches Doppelringsystem enthält, wurde eine rund dreimal größere Komplexbildungskonstante gefunden, während diese bei dem noch mehr π -Elektronen enthaltenden Chlorpromazin sogar 8 mal größer ist.

Aus den Komplexbildungskonstanten der Verbindungen der Gruppe B ist der Einfluß der Substituenten am aromatischen System auf die Komplexbildung zu ersehen.

Beim Vergleich der für Benzoesäureaethylester, Nipagin und Benzocain gefundenen Werte ist zu erkennen, daß die Einführung eines + M - Substituenten die Komplexbildung begünstigt. Die durch die Erhöhung der Elektronendichte im aromatischen

System bzw. an der Carbonylgruppe hervorgerufenen Erhöhung der Komplexstabilität ist aber wesentlich kleiner als die, die durch Ankondensation eines weiteren aromatischen Ringes bewirkt wird (z.B. Cinchocain, Chlorpromazin).

Man kann daraus schließen, daß die Komplexbildungstendenz der Lokalanaesthetika in erster Linie von dem Vorhandensein und der Art eines π -Elektronensystems abhängig ist, wobei die Substituenten die Komplexbildung nur in untergeordneter Weise beeinflussen.

Vergleicht man Verbindungen der Gruppe B mit ähnlichen Verbindungen der Gruppe A, die jedoch einen aliphatischen gebundenen Stickstoff in der Seitenkette besitzen, so findet man, daß die Komplexbildungskonstanten der aliphatischen Aminoverbindungen nur 0,5 bis 0,25 so groß sind wie die der Verbindungen der Gruppe B (vgl. Tabelle 4)

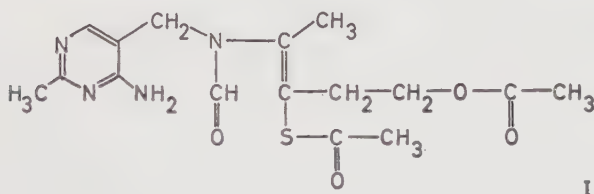
Tabelle 4

Vergleich der Komplexbildungskonstanten der Gruppen A und B

Verbindung Gr. A	K	Verbindung Gr. B	K
Procain	3,0	Benzocain	9,0
mostacain ^R	2,0	2-Chlor-6-methyl-acetanilid	5,4
Cocain	1,6	Benzoessäureäthyl-ester	7,1
Stadacain ^R	3,4	Nipagin ^R	8,1

Diese Befunde lassen sich durch den +I-Effekt der aliphatischen Aminogruppe erklären.

Um zu prüfen, ob die beobachtete Komplexbildung zwischen Lokalanästhetika und Thiamin von dem Vorhandensein des Thiazol-Ringes und dessen quartären Stickstoff unabhängig ist, wurde ein Solubilisationsversuch mit Benzocain und Diacetylthiamin (I) durchgeführt.



Die Versuchsanordnung entsprach der des Benzocain-Thiamin-Versuchs.

Der beobachtete Anstieg der Löslichkeit des Benzocains mit steigender Diacetylthiamin-Konzentration (vgl. Abb. 7) ist identisch mit dem durch Thiamin verursachten. Die Komplexbildungskonstante unterscheidet sich demnach nicht von der des Benzocain-Thiamin-Komplexes. Daraus ist zu schließen, daß die Öffnung des Thiazol-Ringes im Thiamin die Komplexbildung nicht beeinflußt.

Dieser Befund ist deshalb von Bedeutung, weil möglicherweise - wie im Kapitel 2.3. ausgeführt - dem Thiamin mit geöffnetem Thiazol-Ring bei der Reizleitung im Nerv eine besondere Bedeutung zukommt.

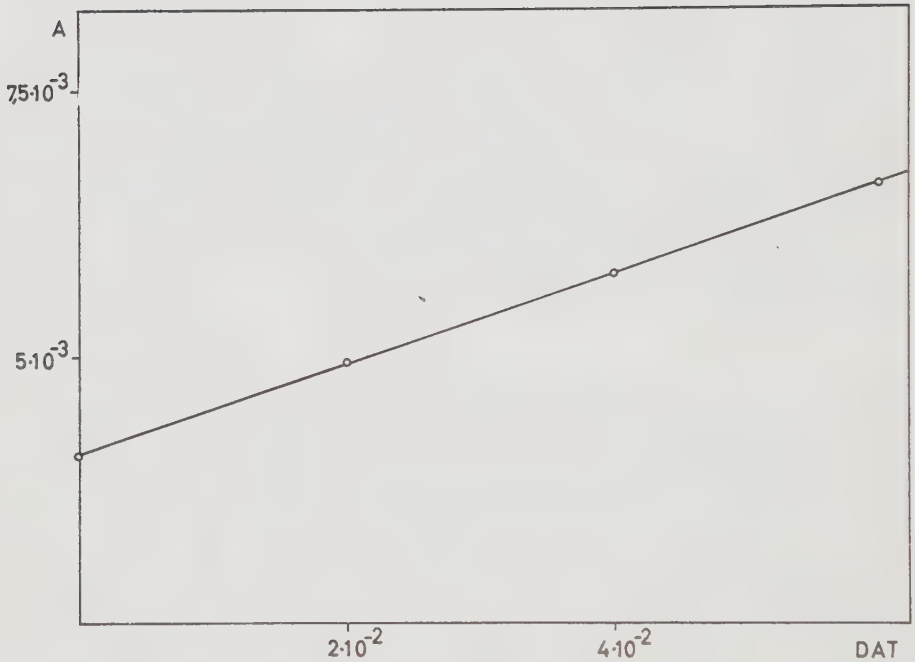


Abb. 7:

Erhöhung der Löslichkeit von Benzocain durch Diacetylthiamin

A = Löslichkeit von Benzocain in Mol/l

DAT = Konzentration an Diacetylthiamin-Hydrochlorid im
Solubilisationsversuch in Mol/l

3.3. Die Komplexe der Lokalanaesthetika mit Adenin bzw. Adeninnucleotiden

Es erhebt sich nun die Frage, ob Lokalanaesthetika auch noch an einer anderen Stelle die biochemischen Reaktionen, die bei der Reizleitung ablaufen, behindern können. Es wurde diskutiert, daß bei der Bildung des Carriers möglicherweise folgende Reaktion eine Rolle spielt:



Die Wechselwirkungen des Thiamins mit Lokalanaesthetika wurden bereits im vorhergehenden Kapitel geschildert. Es war demnach naheliegend zu prüfen, ob Lokalanaesthetika auch mit dem zweiten Reaktionspartner, dem ATP, in Wechselwirkung treten können. Für eine solche Wechselbeziehung scheint der Adeninteil des ATP besonders geeignet, zumal Komplexverbindungen des Procains mit anderen Purin-Derivaten (z.B. Coffein) bekannt sind.

3.3.1. Untersuchung der Lokalanaesthetika-Adenin-Komplexe mit Hilfe der Solubilisationsmethode

Zur Untersuchung wurde zunächst wieder die schon geschilderte Solubilisationsmethode herangezogen. Dabei wurde jeweils ein Überschuß an schwerlöslichem Adenin mit steigenden Konzentrationen an Lokalanaesthetikum-Hydrochlorid-

Lösungen in Puffer geschüttelt und die Löslichkeit des Adenins bestimmt. Die zur Anwendung gekommenen Lokalanaesthetika sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Erläuterungen zu Abbildung 8:

Erhöhung der Löslichkeit von Adenin durch Lokalanaesthetika

- ΔAd = Konzentrationserhöhung des gelösten Adenins in Mol/l
LA = Konzentration der Lokalanaesthetikum-Salze im Solubilisationsversuch in Mol/l
I = Cinchocain-Hydrochlorid
II = Procain-Hydrochlorid
III = Benzoessäurediaethylaminoäthylester-Hydrochlorid
IV = Cocain-Hydrochlorid
V = Hostacain^R-Hydrochlorid
VI = Baycain^R-Hydrochlorid
VII = Scandicain^R-Hydrochlorid und Xylocain^R-Hydrochlorid (identische Werte)

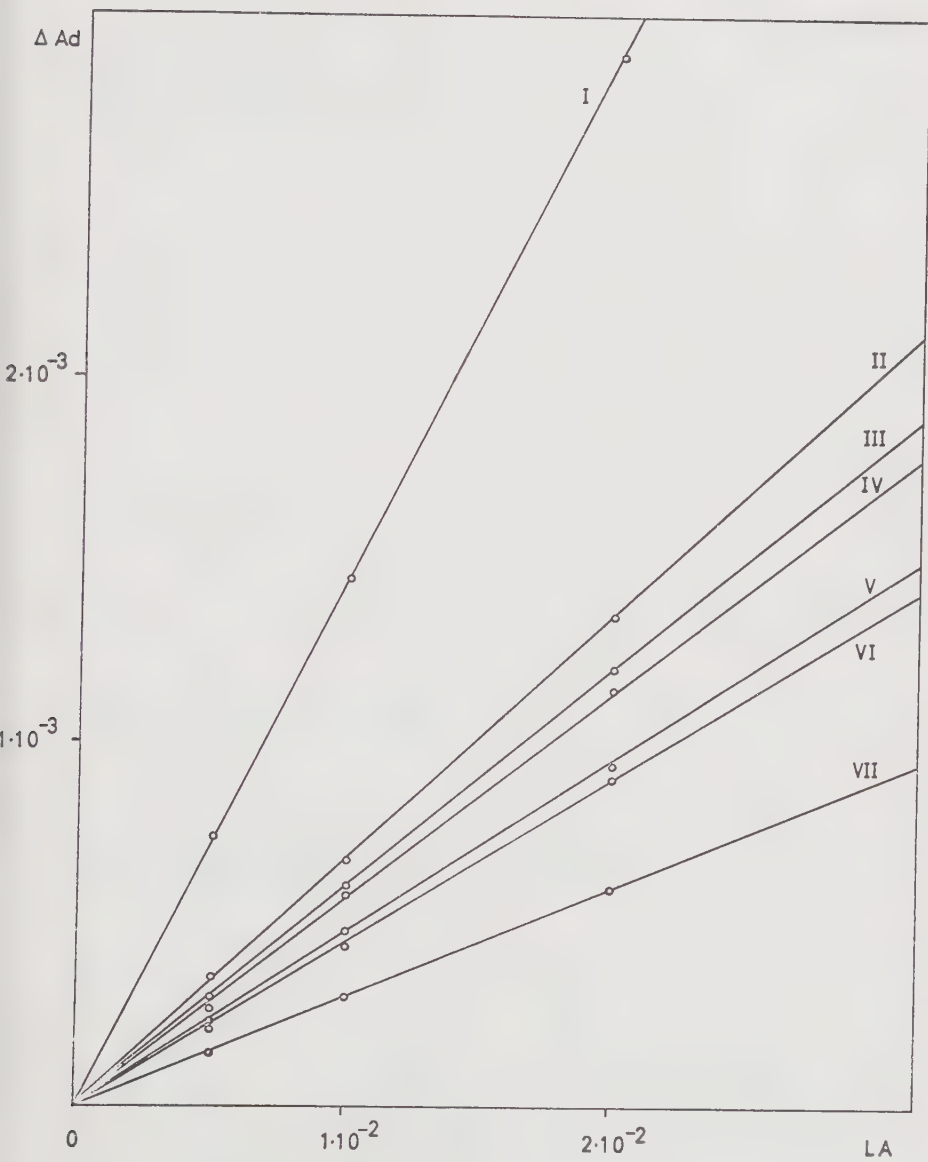
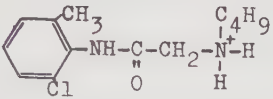
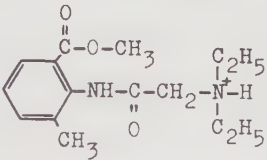
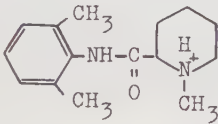
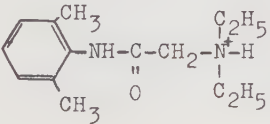


Abb. 8

Tabelle 5:

Zusammenstellung der Lokalanästhetika, deren Komplexbildung mit Adenin untersucht wurde, und der entsprechenden Komplexbildungskonstanten.

Nr.	Formel	Name	K
1		Cinchocain·HCl	17,0
2		Procain·HCl	7,6
3		Benzoessäure-β-diäthylaminoäthylester·HCl	6,5
4		Cocain·HCl	6,3

5	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C(=O)NCC[NH+](C)CCCCl.[Cl-]</chem>	Hostacain ^R	4,9
6	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C(=O)NCC[NH+](C)CCOC(=O)C.[Cl-]</chem>	Baycain ^R	4,8
7	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C(=O)NCC[NH+](C)C1CCCCC1.[Cl-]</chem>	Scandicain ^R	3,1
8	 <chem>CC1=CC=C(C=C1C(=O)NCC[NH+](C)CCOC(=O)C.[Cl-]</chem>	Xylocain ^R	3,1

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Um bei den Versuchen Salz- oder pH-Effekte auszuschließen, wurde Adenin auch in Pufferlösungen mit steigendem Gehalt an β -Diaethylaminoethanol-hydrochlorid solubilisiert. Hier ergab sich kein Anstieg der Löslichkeit des Adenins. Dagegen wurde bei allen eingesetzten Lokalanaesthetika ein Anstieg der in Lösung gegangenen Adenin-Mengen gefunden. Daraus ist zu schließen, daß die Lokalanaesthetika auch mit Adenin Komplexe zu bilden vermögen.

Die Komplexbildungskonstanten wurden nach einer Formel berechnet, die der bei den Thiamin-Lokalanaesthetika-Solubilitätsversuchen abgeleiteten entspricht:

$$K = \frac{[Ad_L] - [Ad_O]}{[Ad_O] \left([L_O] - [Ad_L] + [Ad_O] \right)}$$

In dieser Formel bedeuten:

K = Komplexbildungskonstante der Lokalanaesthetikum-Adenin-Komplexe

$[Ad_L]$ = Konzentration an Adenin, die nach Solubilisation in Lokalanaesthetikum-Lösung gefunden wurde in Mol/l,

$[Ad_O]$ = Konzentration des Adenins, die nach Solubilisation in reiner Pufferlösung gefunden wurde in Mol/l

$[L_O]$ = Konzentration an zugesetztem Lokalanaesthetikum in Mol/l.

Die so ermittelten Komplexbildungskonstanten sind ebenfalls in Tabelle 5 wiedergegeben.

Aus dem Vergleich der gefundenen K_{as} -Werte ergibt sich auch hier, daß genau wie bei den Lokalanaesthetikum-Thiamin-Komplexen die Größe des aromatischen Systems der Lokalanaesthetika die Komplexstabilität entscheidend beeinflußt. So wird für das ein aromatisches Doppelringsystem enthaltende Cinchocain ein K_{as} -Wert von 17,0 gefunden, während die Werte für alle anderen hier aufgeführten Verbindungen, die nur einen aromatischen Ring enthalten unter 8 liegen.

Beim Vergleich der Komplexbildungskonstanten der Verbindungen 2-8 lassen sich nochmals zwei Gruppen unterscheiden:

1. Die Benzoessäureester-Derivate mit Komplexbildungskonstanten zwischen 6 und 8.
2. Die Lokalanaesthetika vom Anilid-Typ, die K_{as} -Werte zwischen 3 und 5 besitzen.

Diese Erscheinung, die auch bei den Lokalanaesthetika-Thiamin-Komplexen beobachtet werden kann, ist offenbar auf die stärkere Polarisierung der Benzoessäureester-Derivate gegenüber den Anilid-Verbindungen zurückzuführen.

Der gleiche Effekt kann auch innerhalb der Benzoessäureester-Gruppe, also bei den Verbindungen 2-4, wenn auch in viel kleinerem Ausmaß, beobachtet werden:

So bildet zum Beispiel das durch Einführung der Amino-Gruppe in den Ring stärker polare Procain stabilere Komplexe als der Benzoessäurediaethylaminoäthylester und das Cocain.

Die Art der aliphatischen Aminokomponente wirkt sich wahrscheinlich auch auf die Komplexstabilität aus. Dieser Einfluß ist jedoch offenbar bei den untersuchten Verbindungen so klein, daß die dadurch verursachten Abweichungen innerhalb der Fehlergrenze der angewendeten Methode liegen. So werden zum Beispiel für Verbindungen, die sich nicht im aromatischen Teil des Moleküls, sondern nur in ihrer aliphatischen Aminokomponente unterscheiden, wie etwa beim Cocain und dem Benzoessäure-diaethylaminoäthylester oder beim Scandicain^R und Xylocain^R praktisch identische K_{as} -Werte gefunden.

Vergleicht man die für die Adenin- Lokalanaesthetikum-Komplexe gefundenen K_{as} -Werte mit denen der Thiamin-Lokalanaesthetikum-Komplexe, so findet man für alle vergleichbaren Verbindungen mit Ausnahme des Cocains für die Adenin-Lokalanaesthetikum-Komplexe 2,4 - 2,5 mal größere Werte.

3.3.2. Spektrophotometrische Untersuchungen der Komplexbildung zwischen Lokalanaesthetika und AMP

Zur näheren Charakterisierung der Lokalanaesthetikum-Adenin-Komplexe wurden spektrophotometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die langwelligsten Absorptionsbanden von reinen Tetracain- bzw. Cinchocain-Lösungen mit den bei gleichzeitiger Anwesenheit von AMP erhaltenen Banden

verglichen. Alle Messungen wurden mit gleichen Konzentrationen an Lokalanaesthetikum und bei pH 6,06 durchgeführt.

Beim Tetracain wurde durch AMP eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 310 nm nach 314 nm hervorgerufen. Gleichzeitig wurde die Extinktion im Maximum erniedrigt. (vgl. Abb. 9)

Beim Cinchocain konnte die Verschiebung des Maximums zwar nicht beobachtet werden, die Extinktionserniedrigung im Absorptionsmaximum ist jedoch auch hier deutlich (Abb. 10). Der Vergleich der bei $+ 21^{\circ}$ und $- 10^{\circ}$ aufgenommenen Banden zeigt, daß die Absorption der reinen Cinchocain-Lösung sich praktisch nicht ändert. Die Extinktionserniedrigung durch AMP wird jedoch durch tiefe Temperaturen wesentlich größer (vgl. Abb. 11).

Alle hier auftretenden Veränderungen der langwelligsten Absorptionsbanden weisen auf eine Wechselbeziehung zwischen den Lokalanaestetika und Adenin bzw. AMP hin. Die Temperaturabhängigkeit läßt auf eine veränderte Gleichgewichtseinstellung der Komplexbildungsreaktion schließen.

Erläuterungen zu den Abbildungen 9 - 11

Veränderung der UV-Absorptionsspektren von Tetracain
und Cinchocain durch AMP.

Abbildung 9:

- I = Spektrum der reinen Tetracain-Lösung
II = Spektrum des Tetracains bei Anwesenheit von AMP
(Rechts oben Spektrum des Tetracains von 220 nm bis 360 nm)

Abbildung 10:

- I = Spektrum der reinen Cinchocain-Lösung bei -10°
II = Spektrum des Cinchocains bei -10° bei Anwesenheit
von AMP
(Rechts oben Spektrum des Cinchocains von 220 nm bis 360 nm)

Abbildung 11:

- I = Spektrum des Cinchocains bei Anwesenheit von AMP
Meßtemperatur $+ 21^{\circ}$
II = Spektrum des Cinchocains bei Anwesenheit von AMP
Meßtemperatur $- 10^{\circ}$

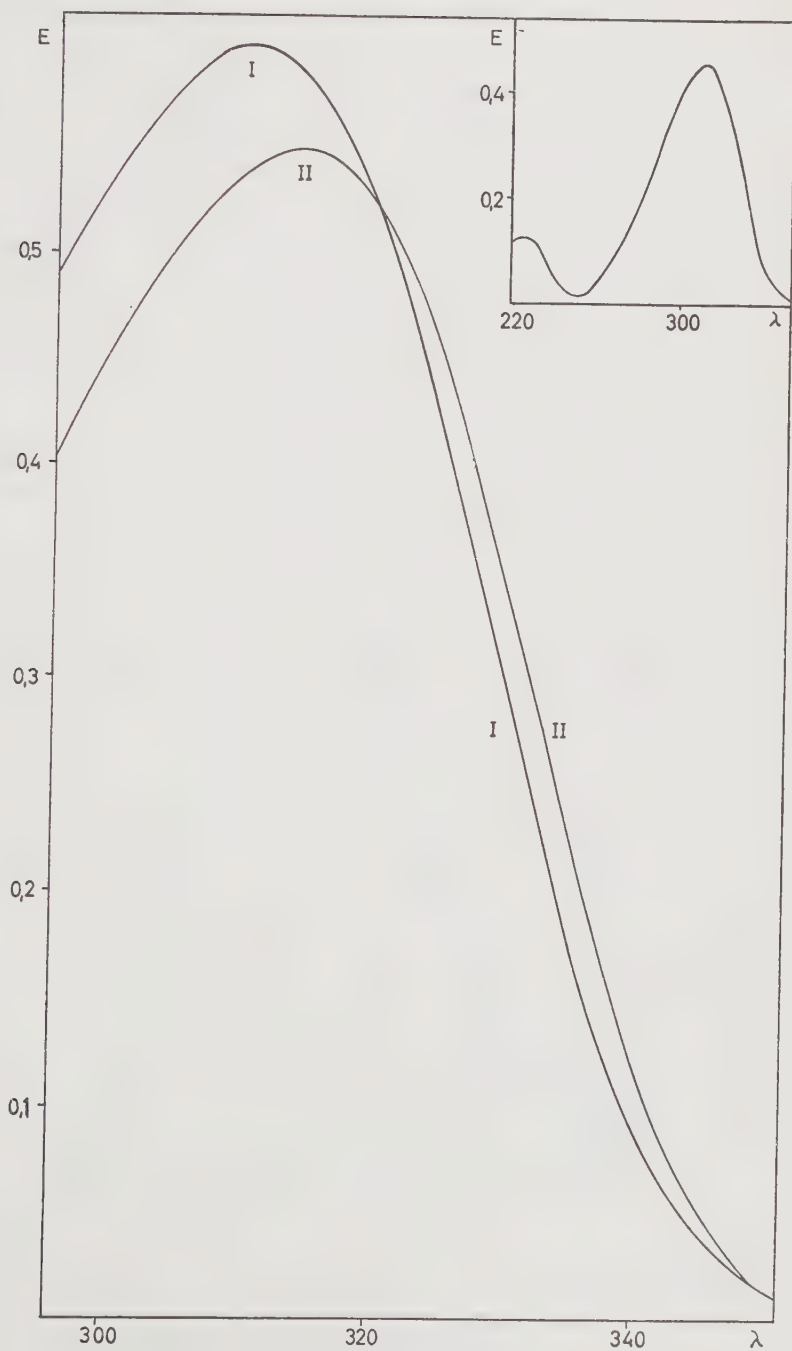


Abb. 9

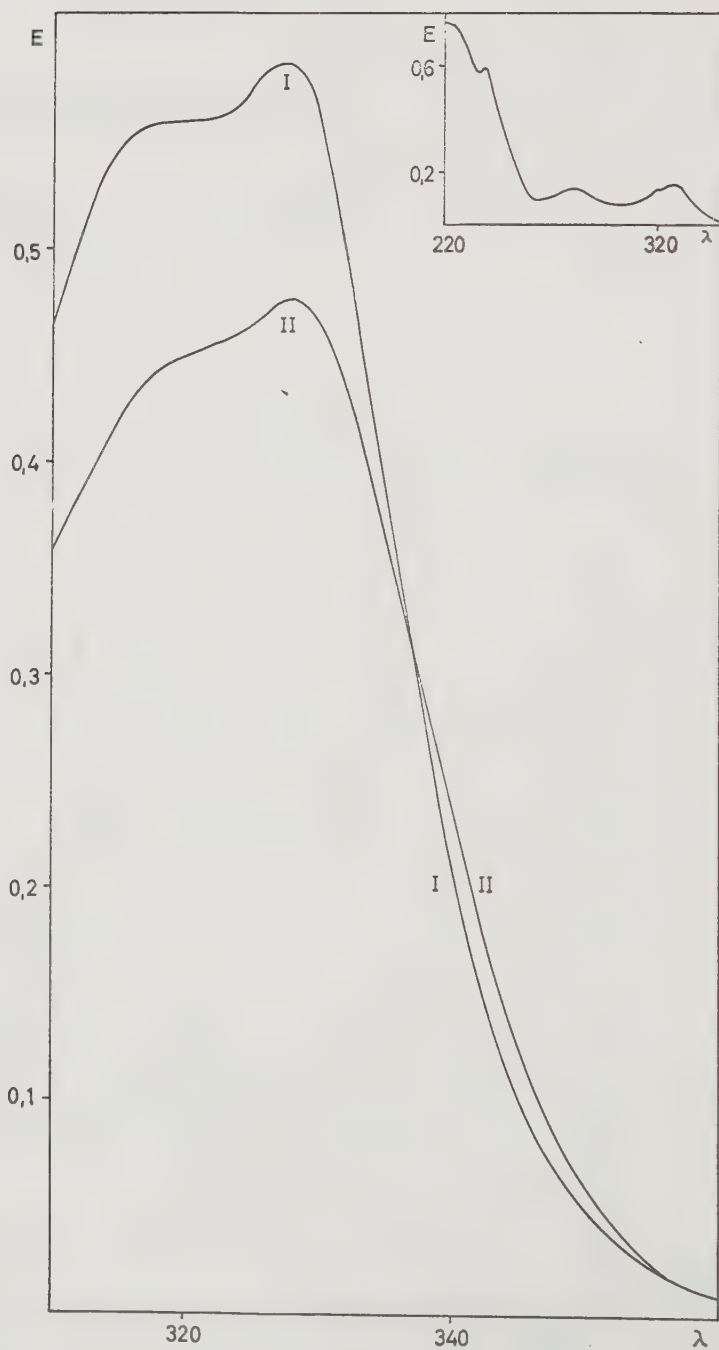


Abb. 10

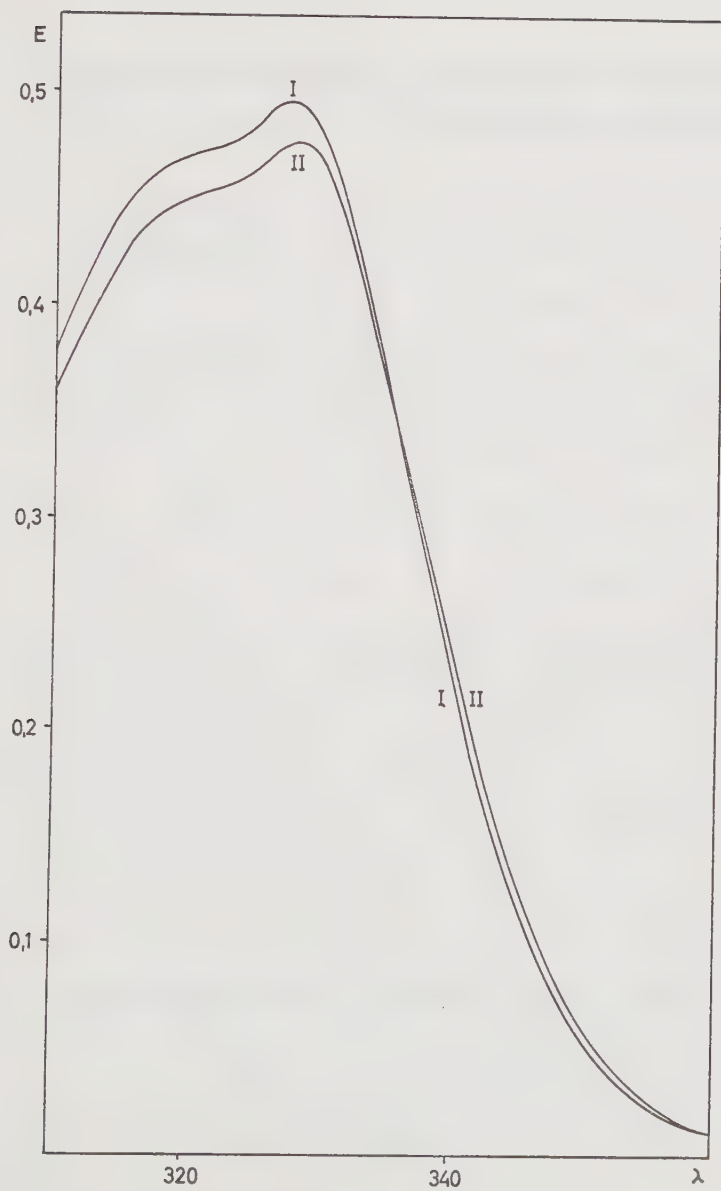


Abb. 11

3.3.3. Enzymkinetische Untersuchungen zum Nachweis der Lokal- anaesthetikum-ATP-Komplexe

Nachdem nachgewiesen war, daß Lokalanaesthetika in der Lage sind, mit Thiamin und Adenin bzw. AMP Komplexe zu bilden, war es naheliegend zu untersuchen, inwieweit diese Komplexbildung sich hemmend auf enzymkatalysierte Reaktionen auswirkt, an denen ATP bzw. TDP als Reaktionspartner beteiligt sind. Die Reaktion



der möglicherweise bei der Reizleitung im Nerven eine Rolle spielt, ist für kinetische Untersuchungen meist technisch schwer zugänglich. Außerdem ist die mathematische Behandlung eines Systems, bei dem zwei Reaktionspartner gleichzeitig zur Komplexbildung mit dem Hemmstoff befähigt sind, nicht ganz einfach. Deshalb wurde zunächst ein einfacheres Enzymsystem als Modell zur Untersuchung herangezogen, bei dem nur ATP in der Lage ist, mit dem Hemmstoff einen Komplex zu bilden.

Am geeignetsten erschien hierfür die Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat mit ATP zu D-1,3-Diphosphoglycerat mit Hilfe von Phospho-Glycerat-Kinase (I)



Das gebildete 1,3-PGP wird mit DPNH und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase zu Glycerinaldehydphosphat reduziert (II)



Mit Hilfe dieser Indikatorreaktion (II) läßt sich der zeitliche Verlauf der Phosphorylierungsreaktion durch Messung der DPNH-Abnahme bei 366 nm verfolgen, vorausgesetzt, daß alle Hilfsenzyme und Substrate in genügend großem Überschuß vorhanden sind, so daß die erste Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

Durch Untersuchung mit variierenden DPNH-Konzentrationen konnte nachgewiesen werden, daß eine möglicherweise vorhandene Hemmung im Indikator-System die kinetische Verfolgung der Transphosphorylierungs-Reaktion wegen des eingesetzten hohen Überschusses an DPNH nicht beeinträchtigt.

Als Hemmstoff wurde bei den kinetischen Untersuchungen Procain verwendet. Der reine Salz- und pH-Effekt wurde durch Zugabe aequimolarer Mengen β -Diaethylamino-aethanolhydrochlorid zu den entsprechenden Vergleichsversuchen ausgeglichen. Es zeigte sich in allen Fällen, daß die untersuchte Phosphorylierungsreaktion durch Procain gehemmt wird.

Zur Ermittlung des Hemm-Mechanismus wurden die gefundenen Anfangsgeschwindigkeiten v in folgende Koordinatensysteme eingetragen (vgl. Tabelle 7 und Abb. 12 - 15):

Tabelle 7

Übersicht über die verwendeten Koordinaten-Systeme

Nr.	Ordinate	Abszisse	Autoren
1.	$\frac{1}{v}$	$\frac{1}{[S_0]}$	Lineweaver, Burk (109)
2.	$\frac{[S_0]}{v}$	S_0	Lineweaver, Burk (109)
3.	v	$\frac{v}{[S_0]}$	Eadie (110), Augustin- son (111), Hofstee (112)
4.	$\frac{1}{i}$	$\frac{1}{[I]}$	Webb (113)

In Tabelle 7 und in den Abbildungen 12-15 wurden Symbole folgender Bedeutung verwendet:

v = Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in $\frac{\text{Mol}}{\text{l. min}}$,

$[S_0]$ = Zugesezte Substratmenge in $\frac{\text{Mol}}{\text{l}}$,

$[I]$ = Hemmstoffmenge in $\frac{\text{Mol}}{\text{l}}$,

i = Hemmkoeffizient $= \frac{v_0 - v_1}{v_0}$, wobei $v_0 =$

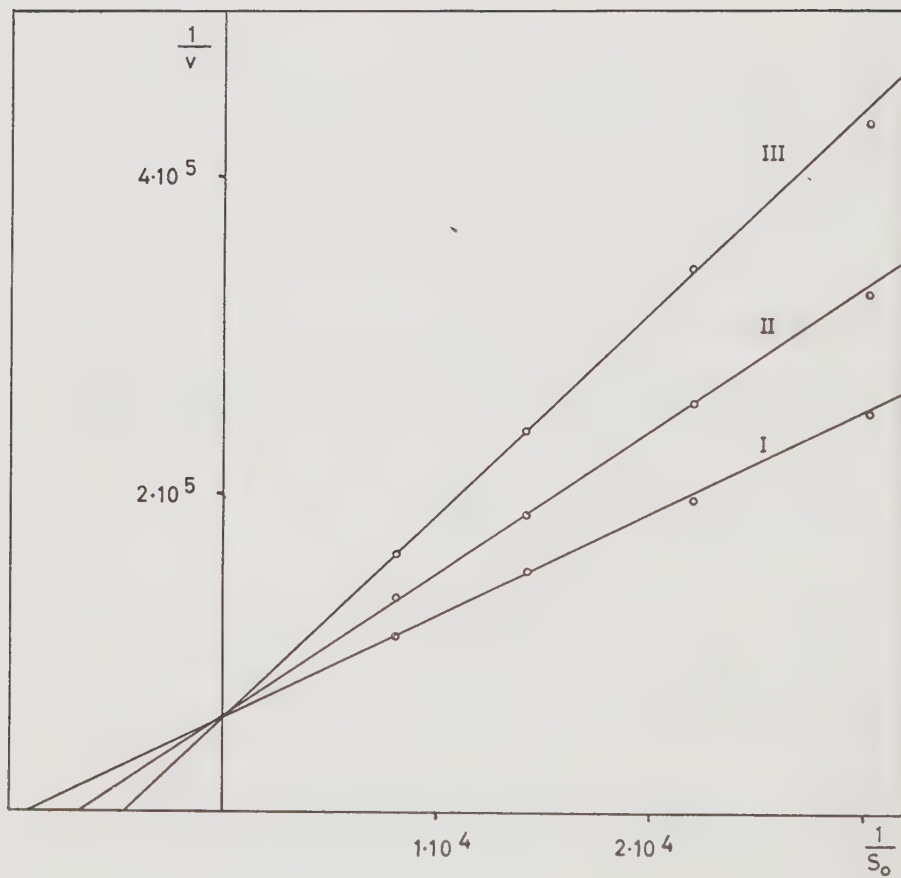
Anfangsgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion und $v_1 =$
Anfangsgeschwindigkeit der gehemmten Reaktion bedeuten.

Erläuterungen zu den Abbildungen 12 - 15:

Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit v von der Substrat- bzw. Hemmstoff-Konzentration zur Ermittlung des Hemm-Mechanismus.

In den Abbildungen 12 - 14 bedeuten

- I = Kinetik ohne Hemmstoff-Zusatz
- II = Kinetik nach Zusatz von $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ Procain-Hydrochlorid
- III = Kinetik nach Zusatz von $5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ Procain-Hydrochlorid



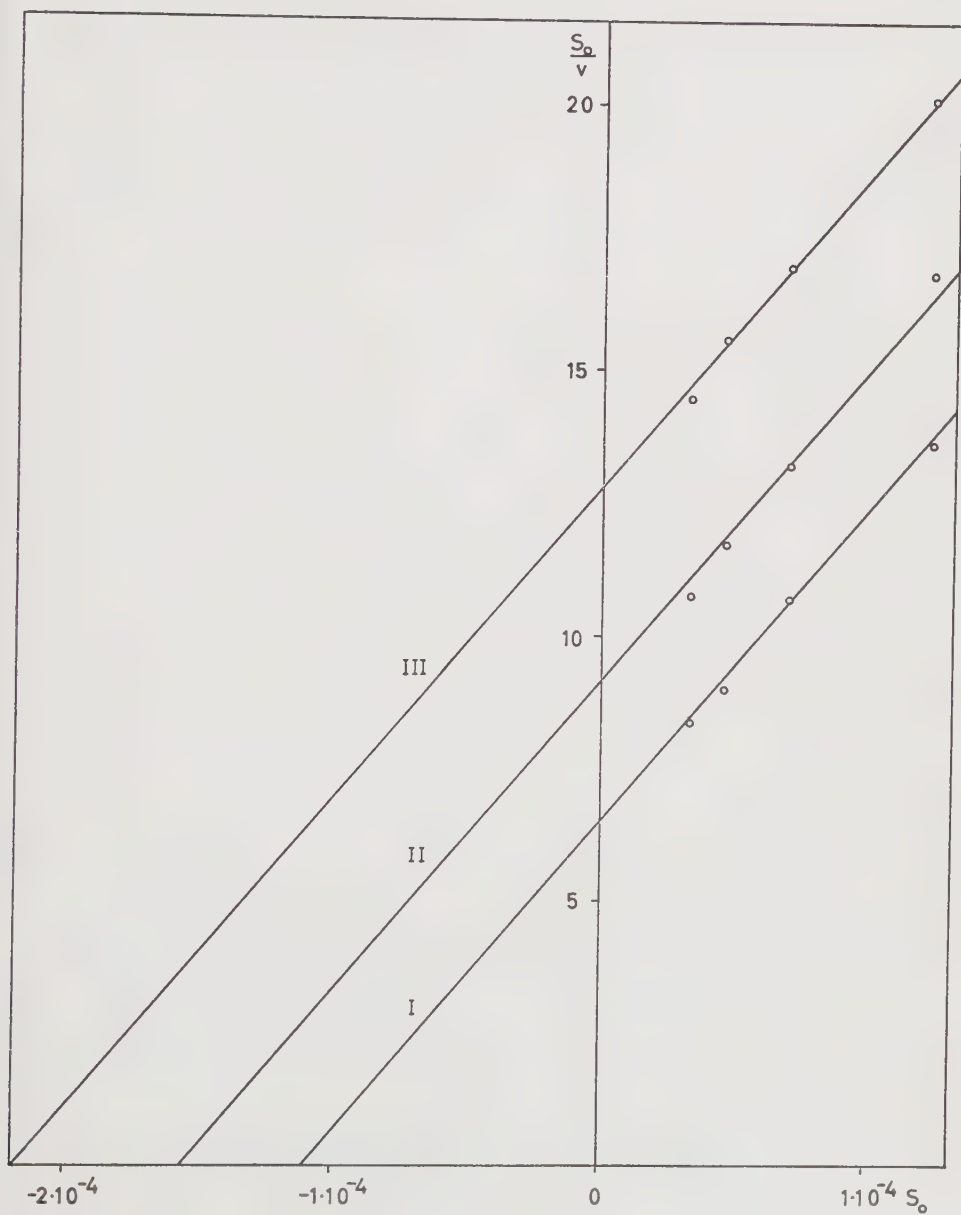


Abb. 13

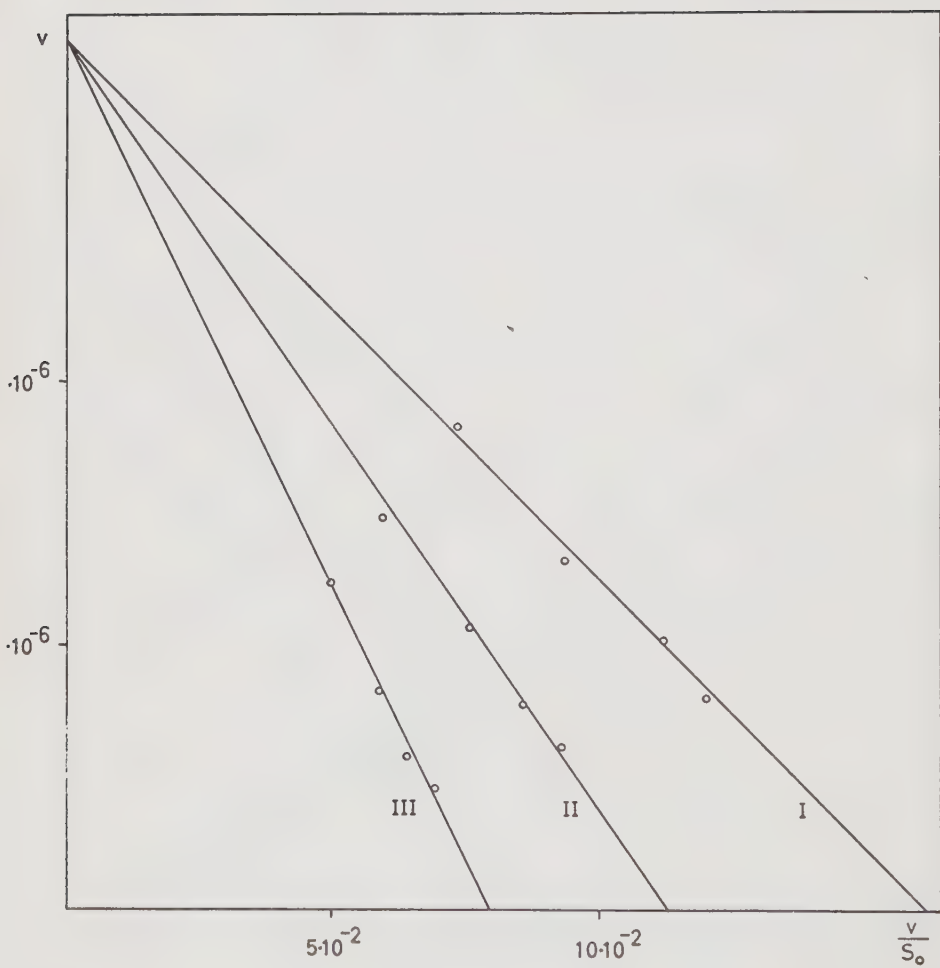


Abb. 14

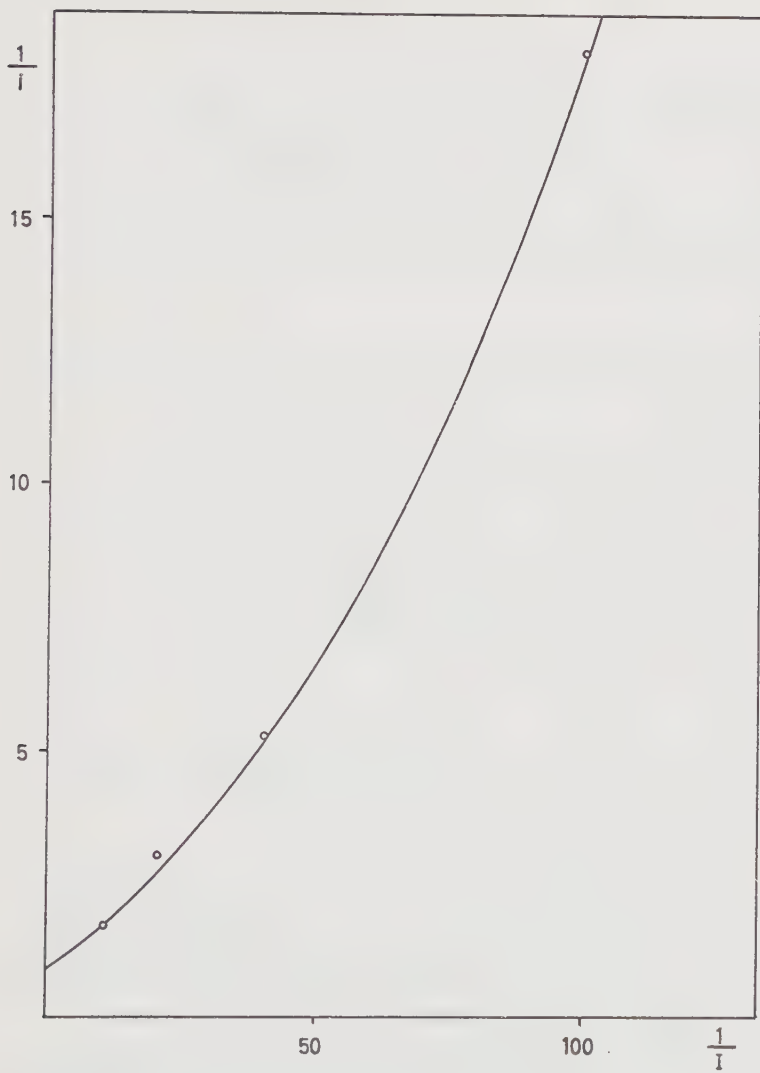


Abb. 15

Die Darstellungen in den Koordinatensystemen 1,2 und 3 ergaben scheinbar das Vorliegen einer kompetitiven Hemmung. (vgl. Abb. 12-14). Im Koordinatensystem 4 zeigte sich jedoch deutlich, daß eine Hemmung auf Grund eines Komplexes des Hemmstoffes mit ATP vorliegt (IS-Hemmung) (vgl. Abb. 15).

Eine Klärung dieses Widerspruches ergibt sich aus folgender Überlegung:

Bei ungehemmten enzymkatalysierten Reaktionen ist die Menge an freiem Substrat S praktisch gleich der Menge an Gesamtsubstrat S_0 , da durch die Bildung des Enzym-Substratkomplexes ES die Menge des Gesamt-Substrates praktisch nicht verändert wird. Es gilt somit:

$$[S_0] - [ES] = [S] = [S_0]$$

Bildet jedoch ein dem Inkubations-Ansatz zugesetzter Hemmstoff mit dem Substrat einen Komplex, so ist

$$[S] < [S_0]$$

Es gilt:

$$K_{IS} = \frac{[S] \cdot [I]}{[IS]} \quad (1)$$

wobei K_{IS} = Dissoziationskonstante des Hemmstoff-Substrat-Komplexes

$[I]$ = Konzentration an freiem Hemmstoff

$[IS]$ = Konzentration an Hemmstoff-Substrat-Komplex

$[I_0]$ = Konzentration an zugesetztem Hemmstoff

Für den bei unseren Untersuchungen vorliegenden Fall, daß

$$[IS] \ll [I]$$

gilt:

$$[I] = [I_0]$$

Es gilt weiterhin:

$$[S] = [s_0] - [IS] \quad (2)$$

Aus (1) und (2) folgt:

$$K_{IS} = \frac{[S][I_0]}{[s_0] - [S]}$$

und somit:

$$S = \frac{[s_0]}{\frac{[I_0]}{K_{IS}} + 1} \quad (3)$$

Dieser Ausdruck für S kann nun in die verschiedenen, den Koordinatensystemen 1 - 3 entsprechenden Umformungen der Michaelis-Gleichung eingesetzt werden:

1. Koordinatensystem $\frac{1}{v}$ / $\frac{1}{[S_0]}$ (Abb. 12)

Setzt man (3) in die reziproke Form der Michaelis-Gleichung (4) ein, so gilt (5) :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m [S]} + \frac{1}{V_m} \quad (4)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m [S_o]} \left[\frac{[I_o]}{K_{IS}} + 1 \right] + \frac{1}{V_m} \quad (5)$$

Daraus folgt, daß beim Auftragen von $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[S_o]}$ im Falle einer (IS)-Hemmung und unter Voraussetzung, daß $[I_o] \gg [IS]$ eine Gerade resultieren muß, die steiler ist als bei der ungehemmten Reaktion, aber den gleichen Schnittpunkt wie diese mit der $\frac{1}{V_m}$ - Achse hat. Die (IS)-Hemmung gibt sich also für den hier diskutierten Fall, daß $[I_o] = [I]$ ist, abweichend von den Angaben Webbs (113), genau so zu erkennen wie eine kompetitive Hemmung, deren Kinetik durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m [S_o]} \left[\frac{[I_o]}{K_I} + 1 \right] + \frac{1}{V_m}$$

wobei K_I die Dissoziationskonstante des Hemmstoff-Enzym-Komplexes bedeutet.

Setzt man $\frac{1}{v} = 0$, so erhält man für den Schnittpunkt der Geraden der gehemmten Reaktion mit der $\frac{1}{[S_o]}$ - Achse :

$$-\frac{1}{[S_o]} = \frac{1}{K_m \left[1 + \frac{[I_o]}{K_{IS}} \right]}$$

Aus dieser Gleichung kann K_{IS} berechnet werden.

2. Koordinatensystem $\frac{[S_o]}{v} / [S_o]$ (Abb. 13)

Für das Koordinatensystem $\frac{[S]}{v} / [S]$ lautet die umgeformte Michaelis-Gleichung der ungehemmten Reaktion

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_m} + \frac{K_m}{V_m}$$

Setzt man in diese Gleichung wieder die Beziehung (3) ein, so erhält man

$$\frac{[S_o]}{v} = \frac{[S_o]}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left[\frac{[I_o]}{K_{IS}} + 1 \right]$$

Daraus ist zu entnehmen, daß bei einer Hemmung auf Grund einer Komplexbildung des Hemmstoffes mit dem Substrat, wenn $[I_o] = [I]$, in diesem Koordinatensystem eine Gerade erhalten wird, die die gleiche Neigung wie die der ungehemmten Reaktion, nämlich $\frac{1}{V_m}$, aufweist. Der Schnittpunkt mit der Ordinate liegt aber um den Betrag $\frac{[I_o]}{K_{IS}} + 1$ höher.

Auch hier findet man also die gleichen Verhältnisse wie bei einer kompetitiven Hemmung.

3. Koordinatensystem $v / \frac{v}{[S]}$ (Abb. 14)

Für das Koordinatensystem $v / \frac{v}{[S]}$ lautet die umgeformte Michaelis-Gleichung der ungehemmten Reaktion:

$$v = V_m - \frac{K_m}{[S]} v$$

Auf Grund der gleichen Überlegungen wie vorher erhält man daraus für eine (IS)-Hemmung, wenn $[I_o] = [I]$:

$$v = V_m - K_m \frac{v}{[S_o]} \left[\frac{[I_o]}{K_{IS}} + 1 \right]$$

Auch in diesem Koordinatensystem findet man also das gleiche Bild wie bei einer kompetitiven Hemmung, nämlich den gleichen Schnittpunkt auf der v -Achse V_m und einen um den Betrag $\frac{[I_o]}{K_{IS}} + 1$ steileren Abfall der Geraden der gehemmten Reaktion.

Diskussion

Aus diesen Überlegungen ist zu schließen, daß die drei ersten Koordinatensysteme nicht geeignet sind für die Unterscheidung einer kompetitiven Hemmung von einer Hemmung, die durch die Bildung eines schwachen Komplexes zwischen Hemmstoff und Substrat hervorgerufen wird, das heißt in einem System, wo $[I_o] = [I]$ ist.

Im Gegensatz zu kompetitiven Hemmungen sind IS-Hemmungen in der Literatur nur selten beschrieben (113-115). Auf Grund der oben beschriebenen Überlegungen ist es aber durchaus denkbar, daß manche in der Literatur als kompetitiv beschriebene Hemmung tatsächlich eine IS-Hemmung darstellt.

Aus den Kurven 1 - 3 lassen sich jedoch die K_{IS} -Werte grafisch ermitteln.

Aus mehreren Ansätzen ergibt sich für den Procain-ATP-Komplex eine Dissoziationskonstante von $5,0 \cdot 10^{-2}$. Dieser Wert weicht von dem mit Hilfe der Solubilisationsmethode für den Procain-Adenin-Komplex gefundenen Wert von $13,2 \cdot 10^{-2}$ geringfügig ab. Dies ist zum Teil auf den unterschiedlichen pH-Wert der Bestimmungsmethoden zurückzuführen.

Wird mit der Solubilisationsmethode der K_{IS} -Wert bei dem gleichen pH-Wert wie bei den kinetischen Untersuchungen bestimmt, so erhält man einen Wert von $10,4 \cdot 10^{-2}$. Mögliche Erklärungen für die noch verbleibende geringe Abweichung sind die stark unterschiedliche Methodik und die Tatsache, daß bei der enzymkinetischen Bestimmung mit ATP gearbeitet wurde, während bei der Solubilisierung Adenin verwendet wurde. Aus der weitgehenden Übereinstimmung der mit Hilfe der beiden Methoden gefundenen K_{IS} -Werte und auf Grund der Tatsache, daß sich im $\frac{1}{I}$ / $\frac{1}{I}$ - Koordinatensystem ein nach oben abkrümmender Kurvenverlauf ergibt, darf die Komplexbildung zwischen ATP und Procain als Ursache für die

gefundene Hemmung der untersuchten Transphosphorylierungs-Reaktion angesehen werden.

3.4. Zur Frage des Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetika

Aus der gefundenen Hemmung einer Phosphotransferase auf Grund der Komplexbildung der Lokalanaesthetika mit ATP darf geschlossen werden, daß auch die ATP:TDP-Phosphotransferase im Nervengewebe gehemmt wird. Der Effekt wird dort wahrscheinlich sogar noch größer sein, da sowohl der Phosphat-Donor als auch der Phosphat-Akzeptor zur Komplexbildung mit Lokalanaesthetika befähigt sind.

Wenn der ATP:TDP-Phosphotransferase im Nervengewebe tatsächlich die ihr zuge dachte Rolle in der ersten Erregungsphase zukommt, dann würden im Falle einer Hemmung der von ihr katalysierten Reaktion durch Lokalanaesthetika in der ersten Erregungsphase zu wenig aktive Träger entstehen können. Aber auch dann, wenn der Hemmung dieser Reaktion nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt, kann durch Komplexbildung der Lokalanaesthetika mit TTP, das möglicherweise Carrier-Funktion ausübt, der Einstrom von Na^+ -Ionen in der ersten Phase der Nerven erregung gehemmt werden.

In beiden Fällen würde die für die Umpolarisierung nötige Menge an Na^+ -Ionen nicht durch die Membran gelangen können und somit eine Unterbrechung der Reizleitung resultieren.

Die Hypothese, daß Lokalanaesthetika ihre Wirkung über eine Komplexbildung mit ATP bzw. Thiaminphosphaten hervorrufen, wird durch folgende Befunde gestützt:

- 1.) Die lokalanaesthetische Wirkung von Procain wird durch ATP geschwächt (116).
- 2.) Hazard, Cheymol, Lechat und Deleau (117) fanden, daß die durch Dibucain, Procain und Lignocain an der Kaninchen-Cornea hervorgerufene Anaesthetie durch Thiamin abgeschwächt wird.

Allerdings ist die Abschwächung des lokalanaesthetischen Effekts abhängig vom Applikationsort und von der Konzentration des Lokalanaesthetikums und des Thiamins.

So konnten die oben erwähnten Autoren (117) keine Beeinflussung der Leitungs- und Infiltrationsanaesthetie mit Procain am Kaninchen und einer Verlängerung der Spinalanaesthetie beobachten.

Quevauviller und Laroche (118) fanden, daß die anaesthetische Wirkung einer 5%igen Procain-Lösung durch Zusatz von 0,06 m Thiamin erniedrigt, durch 0,013 m Thiamin erhöht wird.

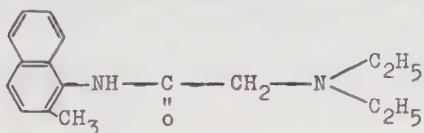
Dagegen wurde die anaesthetische Wirkung einer 10%igen Procain-Lösung durch Zusatz von 0,006 m bis 0,06 m Thiamin in allen Fällen erniedrigt.

- 3.) Die lokalanaesthetische Wirksamkeit ist - genau wie die beschriebene Komplexbildung - kaum an eine spezifische Struktur gebunden.

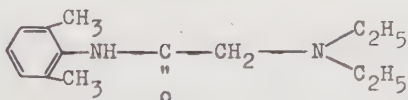
Der Erhöhung der Komplexstabilität durch Einführung eines +M-Substituenten in das Wirkstoff-Molekül entspricht die Tatsache, daß man bei fast allen gut wirk-

samen Lokalanaesthetika Amino-, Alkylamino-, oder Alkoxy-Gruppen findet.

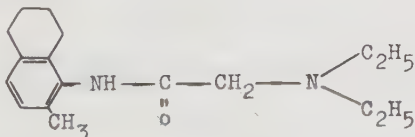
Auch die Vergrößerung des π -Elektronensystems bewirkt nicht nur, wie bereits erwähnt, stabilere Komplexe, sondern ruft parallel dazu stärkere lokalanaesthetische Wirksamkeit hervor. Es wurde festgestellt, daß das 1-(Diaethylaminoacetyl-amino)-2-methyl-naphtalin



etwa doppelt so wirksam ist wie das Xylocain



Dieser Effekt geht tatsächlich nur auf die Ankondensierung des zweiten aromatischen Ringes zurück und nicht etwa auf die Verstärkung der lipophilen Eigenschaften durch Hinzukommen von weiteren vier Kohlenstoff-Atomen, denn das 1-(Diaethylaminoacetyl-amino)-2-methyl-5,6,7,8-tetrahydronaphtalin



zeigt nur die gleiche Wirksamkeit wie das Xylocain bei der Prüfung im Quaddelversuch am Meerschweinchen (119).

4.) Daß die geschilderte Komplexbildung für die Wirkung der Lokalanaesthetika von Bedeutung ist, geht auch aus den im nächsten Kapitel aufgezeigten Beziehungen zwischen lokalanaesthetischer Wirksamkeit, Verteilungskoeffizient und Komplexbildungskonstanten einer Reihe von isomeren und homologen Alkoxybenzoesäureestern hervor.

3.5. Beziehungen zwischen leitungsanaesthetischer Wirksamkeit, Verteilungskoeffizient und Komplexbildungskonstanten einer Reihe von isomeren und homologen Alkoxybenzoesäure-diaethyl-aminoäthylestern.

Wenn die geschilderte Komplexbildung der Lokalanaesthetika am Wirkort die Ursache für die Unterbrechung der Reizleitung im Nerven ist, so sollte man annehmen, daß die pharmakologische Wirkung eines Lokalanaesthetikums seiner Komplexbildungskonstanten K direkt proportional ist.

Die Wirkung W wird jedoch zweifellos auch noch von der Konzentration des am Wirkort vorliegenden Lokalanaesthetikums abhängig sein, das heißt, die Wirkung ist auch dem Verteilungskoeffizienten V direkt proportional.

Diese Beziehung kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$W \sim V \cdot K$$

Zur besseren mathematischen Behandlung wurde diese Proportionalitätsbeziehung durch Einführung einer Konstanten a und Logarithmieren in eine Gleichung überführt, die mathematisch gesehen die Funktion einer Geraden darstellt:

$$\lg W_x = a \lg \frac{V_x}{V_o} + \lg \frac{K_x}{K_o} \quad (1)$$

In dieser Gleichung bedeuten:

W_x = relative Wirksamkeit einer Substanz x im Vergleich zu einer Standardsubstanz

V_x = Verteilungskoeffizient der Substanz x

V_o = Verteilungskoeffizient der Standard-Substanz

K_x = Komplexbildungskonstante der Substanz x

K_o = Komplexbildungskonstante der Standard-Substanz

a = Proportionalitätsfaktor

Um die Gültigkeit der Gleichung zu prüfen, wurden die entsprechenden Werte für die homologen und isomeren Alkoxybenzoesäure-diaethylaminoäthylester graphisch dargestellt (vgl. Abb. 16).

Als relative pharmakologische Wirksamkeit wurden die von Hunn (89) gefundenen Werte für die Leitungsanaesthesie eingesetzt. Alle Konzentrationen wurden auf molare Konzentrationen umgerechnet.

Die Werte für die Verteilungskoeffizienten wurden von Ritsert (120) übernommen.

Die Komplexbildungskonstanten wurden nach der Solubilisationsmethode mit Adenin und den drei stellungsisomeren Aethoxybenzoesäureestern bestimmt. Aus mehreren Versuchen ergaben

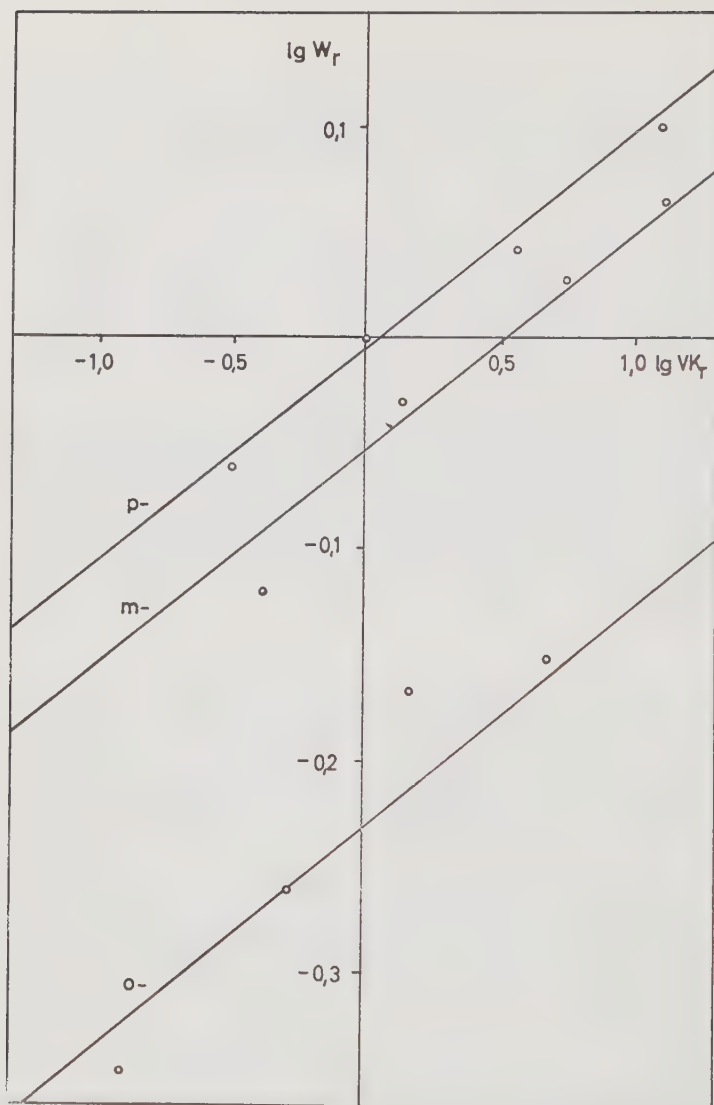


Abbildung 16

Abhängigkeit der relativen pharmakologischen Wirkung (W_r) vom relativen Verteilungskoeffizienten (VK_r) einer Reihe von homologen und isomeren Alkoxybenzoesäureestern.

sich die in Tabelle 7 dargestellten Mittelwerte. Obwohl die Komplexbildungskonstanten der Thiamin-Aethoxybenzoesäureester-Komplexe von denen der entsprechenden Adenin-Komplexe verschieden sind, stehen sie doch untereinander im gleichen relativen Verhältnis.

Tabelle 7

Komplexbildungskonstanten der isomeren
Alkoxybenzoesäureester

Verbindung				K
o-Aethoxybenzoesäurediaethylaminoethylester				6,8
m-	"	"	"	10,8
p-	"	"	"	12,1

Die Unterschiede der K-Werte der jeweiligen Homologen liegen innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode, da der +M-Effekt der homologen Alkoxy-Gruppen nur unwesentlich ansteigt.

Als Standard-Substanz wurde das p-Aethoxy-Homologe gewählt, das als Leitungsanaesthetikum unter dem Namen Intracain^R im Handel ist.

Die erhaltenen Geraden lassen die Gültigkeit der aufgestellten Formel erkennen. Aus der Neigung der Geraden kann a zu 0,10 ermittelt werden.

Es wurden nun mit Hilfe der Formel die relative leitungsanaesthetische Wirksamkeit der vorliegenden Alkoxybenzoe-

säuren berechnet und mit den im pharmakologischen Experiment gefundenen Werten verglichen (vgl. Tab. 8).

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ergibt sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen der errechneten und der experimentell ermittelten Wirksamkeit.

Tabelle 8:

Vergleich der mit Hilfe der Formel (1) berechneten und der im pharmakologischen Versuch ermittelten relativen Wirksamkeit von homologen und isomeren Akoxybenzoesäureestern.

Rest/Stellg.	o		m		p	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
CH ₃ -O-	0,46	0,45	0,81	0,76	0,89	0,87
C ₂ H ₅ -O-	0,53	0,55	0,92	0,94	1,00	1,00
C ₃ H ₇ -O-	0,59	0,69	1,06	1,07	1,14	1,10
C ₄ H ₉ -O-	0,66	0,71	1,15	1,17	1,29	1,26

Aus diesem Ergebnis kann der Schluß gezogen werden, daß die Komplexbildung zwischen den hier untersuchten Lokalanaesthetika und Adeninderivaten bzw. Thiaminderivaten in einem ursächlichen Zusammenhang mit ihrer Wirkung steht und daß möglicherweise das Zusammenwirken von Verteilungseigenschaften und Komplexbildungsvermögen dieser Lokalanaesthetika die pharmakologische Wirksamkeit entscheidend beeinflusst.

Es sollten andererseits aus der Übereinstimmung von Berechnung und gefundener Wirkung auch keine zu weitgehenden Schlüsse gezogen werden. Es ist zwar mit Hilfe der Formel möglich, auch Voraussagen über die Wirkung von Isomeren zu machen, es bleibt aber noch zu prüfen, ob die gefundene Beziehung auch bei vollkommen anders konstituierten Verbindungen gültig ist.

4. Experimenteller Teil

4.1 Herstellung des ATP:TDP-Phosphotransferase Präparates

40 g Rückenmark vom Schwein wurden von Blutresten und festen Gewebeteilen befreit und in 200 ml Pufferlösung (0,05 m Triäthanolamin-hydrochlorid, 0,25 m Saccharose, mit Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt) unter Eiskühlung homogenisiert.

Anschließend wurde 45 Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert und der so erhaltene Überstand in das zehnfache Volumen Aceton bei -15° eingerührt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit 250 ml Aceton von -15° gewaschen und schnell bei möglichst tiefer Temperatur getrocknet.

Das so erhaltene Trockenpulver wurde bei -10° aufbewahrt und war mehrere Monate lang aktiv.

4.2 Inkubationsansätze zum Nachweis der ATP:TDP-Phosphotransferase

Die Inkubationsansätze enthielten folgende Konzentrationen: ATP $2 \cdot 10^{-2}$ m, TDP (bzw. andere Thiaminphosphorsäureester) $2 \cdot 10^{-3}$ m, $MgCl_2$ $5 \cdot 10^{-3}$ m, Saccharose 0,25 m, Triäthanolaminhydrochlorid 0,05 m, 30 mg Aceton-trockenpulver. Das Gesamtvolumen eines Inkubationsansatzes betrug 0,300 ml. Der pH-Wert wurde bei allen Inkubationsansätzen mit Hilfe einer MikroEinstabmesskette Ingold 405/90 M 5 und einem Knick Röhrenvoltmeter Typ 62 auf 7,2 eingestellt. Inku -

biert wurde 20 Stunden bei 37°.

4.3 Elektrophoretische Trennung

Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte hochspannungselektrophoretisch mit Hilfe der Apparatur von Wieland und Pfeleiderer. Als Trägermaterial diente Papier von Macherey und Nagel Nr. 214. Getrennt wurde in einem Puffer, der im Liter 50 ml Pyridin enthielt, und dessen pH-Wert mit Eisessig auf 5,7 eingestellt war. Das Spannungsgefälle betrug 40 V/cm, die Laufzeit 2 Stunden. Die Sichtbarmachung erfolgte durch Ansprühen der noch feuchten Pherogramme mit alkalischer Kaliumferricyanid-Lösung; anschließend wurde im Kaltluftstrom getrocknet und mit authentischen Proben unter dem UV-Licht verglichen.

4.4 Zum Enzymnachweis verwendete Chemikalien

Triäthanolaminhydrochlorid wurde als Handelspräparat von Boehringer, Saccharose als Handelspräparat von Merck, $MgCl_2$ als Präparat pro analysi von Merck und ATP als Handelspräparat von Boehringer verwendet.

Das im Handel befindliche Thiamin und Thiaminmonophosphat von Merck erwiesen sich als hinreichend rein von störenden Verunreinigungen und konnten ohne weitere Vorbehandlungen verwendet werden.

Alle im Handel befindlichen Thiamin-diphosphat-Präparate zeigen jedoch neben Verunreinigungen von Thiamin-monophosphat auch Spuren von Thiamin-Triphosphat. Es war deshalb notwendig, diese Verunreinigungen abzutrennen. Die Reinigung erfolgte über Ionenaustauscher mit Hilfe eines mikropräparativen Verfahrens, das in Anlehnung an ein von L. de Giuseppe und G. Rindi (121) angegebenes analytisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Thiaminphosphorsäureester entwickelt wurde. Alle zu Inkubationsversuchen eingesetzten Thiamin-diphosphat-Präparate waren nach der Ionenaustauscher-Trennung elektrophoretisch rein.

4.5 Reinigung von Thiamindiphosphat-Präparaten mit Hilfe von Ionenaustauschern

Etwa 30 g stark basischer Anionenaustauscher Merck III wurden zunächst mit Salzsäure in die Chlorid-Form überführt und anschließend mit 13 %iger Natriumacetat-Lösung in die Acetat-Form gebracht. Das überschüssige Acetat wurde durch Nachwaschen mit Wasser entfernt.

Etwa 500 mg handelsübliche Cocarboxylase wurde in etwa 10 ml Wasser gelöst und die Lösung mit Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt.

Die Lösung wurde auf die vorbehandelte Austauschersäule gebracht und zunächst mit Wasser Thiamin und Thiamin-monophosphat eluiert. Der Gehalt des Eluates an Thiamin oder Thiaminphosphorsäureestern wurde durch spektrophotometrische Messungen bei 274 nm laufend kontrolliert.

Auf die Elution mit Wasser folgte die Elution von Thiamindiphosphat mit einer Lösung von 0,02 m Natriumacetat in 0,04 m Essigsäure. Durch Eingießen des Eluats in das zehnfache Volumen Aceton konnte das Thiamindiphosphat in feinen Nadeln zur Ausfällung gebracht werden.

Nach der hochspannungselektrophoretischen Trennung der erhaltenen Substanz in einer zehnfach höheren Konzentration als die normalerweise bei Inkubationen verwendete, konnte keinerlei Verunreinigung mehr festgestellt werden.

4.6 Nachweis der Komplexbildung von Thiaminphosphorsäureestern mit Na^+ -und K^+ -Ionen

Für die Versuche wurde handelsübliche Cocarboxylase Merck verwendet. Thiamintriphosphorsäureester wurde nach Viscontini e.a. (122) dargestellt.

0,5 mMol Thiamindiphosphat oder Thiamintriphosphat wurden jeweils in 25 ml 0,2 m $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, 25 ml 0,2 m NaCl bzw. 25 ml 0,2 m KCl gelöst. Anschließend wurde mit 0,2 m $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ -Lösung, die 0,2 m $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, NaCl bzw. KCl enthielt, titriert. Alle Titrationsen wurden in Gefäßen aus Pyrexglas bei $20^\circ \pm 0,1^\circ$ ausgeführt.

In allen Fällen wurde nach jeder Zugabe von 0,20 ml Maßflüssigkeit der pH-Wert mit Hilfe einer Glaselektrode (Einstabmeßkette Ingold Typ 405) und eines Röhrenvoltmeters (Knick Typ 62) gemessen. Vor und nach jeder Titration wurde die Funktion der Messkette mit einer Standard-

Pufferlösung überprüft. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mehreren unabhängig voneinander ausgeführten Titrationen.

4.7 Nachweis der Komplexbildung von Thiamin mit Lokalanaesthetika mit Hilfe der Solubilisationsmethode

Es wurden jeweils 100,0 ml Lösung von Thiaminmononitrat mit Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-2} \text{ m}$, $4 \cdot 10^{-2} \text{ m}$, und $6 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ hergestellt.

Als Lösungsmittel diente für Versuche mit Stoffen der Gruppe A 0,25 m Phosphatpuffer vom pH 6,65, und bei Versuchen mit Stoffen der Gruppe B Wasser. Bei der Untersuchung von Pantocain-Nitrat wurde der oben erwähnte Phosphat-Puffer verwendet und außerdem die Nitrat-Ionen-Konzentration durch Zusatz von Natriumnitrat in allen Ansätzen konstant gehalten. Je 50 ml dieser Lösungen wurden in einem temperierbaren Schüttelgefäß 5 Stunden bei $20^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ mit einem Überschuß an Lokalanaesthetikum geschüttelt.

Zur Ermittlung der Löslichkeit der Lokalanaesthetika wurde in einem weiteren Schüttelgefäß ein Überschuß an Lokalanaesthetika mit reinem Lösungsmittel unter gleichen Bedingungen geschüttelt.

Die Ermittlung der in den einzelnen Schüttelansätzen in Lösung gegangenen Mengen an Lokalanaesthetika erfolgte spektrophotometrisch:

Bei den einzelnen Schüttelansätzen wurde der Überschuß an Lokalanaesthetikum abfiltriert (Filter SS 597, bzw. Blauband bei öligen Basen), wobei die ersten 5 ml des Filtrates verworfen wurden. Die so erhaltenen Filtrate wurden auf geeignete Konzentrationen verdünnt und ihre Extinktion gegen in gleicher Weise behandelte und verdünnte reine Thiaminmononitrat-Lösung bzw. reines Lösungsmittel bei geeigneter Wellenlänge gemessen.

Nach der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten konnte der Gehalt der einzelnen Ansätze errechnet werden. Bei den Versuchen mit Hostacain wurde mit der oben angegebenen Methode ein mit steigender Thiamin-Konzentration kleiner werdender Solubilisationseffekt gefunden. Außerdem färbte sich die überschüssige Lokalanaesthetikum-Base gelb. Es wurde angenommen, daß sich das Thiamin zersetzt und in der Base löst, der Abfall der Löslichkeit also auf einen Thiaminverlust zurückzuführen sei.

Es wurden deshalb die jeweiligen Lösungen des Lokalanaesthetikums und des Thiamins in Puffer gegen Pufferlösung als binäres System bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen und die Konzentration an Hostacain und Thiaminmononitrat rechnerisch ermittelt.

Die so erhaltenen Werte ergaben tatsächlich ein Absinken der Thiaminmononitrat-Konzentration und einen Anstieg der Hostacain-Konzentration. In der Kurve sind die entsprechend korrigierten Werte eingetragen. Bei der Untersuchung mit anderen öligen Basen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Tabelle 9

Lokalanaesthetikum	λ (nm)	$\epsilon \frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}}$	Verdünnung
Hostacain ^R	230	$3,232 \cdot 10^6$	1 : 500
	264	$4,083 \cdot 10^5$	1 : 500
Stadacain ^R	264	$1,752 \cdot 10^7$	1 : 2000
Cinchocain	327	$4,254 \cdot 10^6$	1 : 100
Cocain	230	$1,377 \cdot 10^7$	1 : 1000
Procain	320	$3,397 \cdot 10^6$	1 : 2000
Chlorpromazin	310	$4,125 \cdot 10^6$	1 : 20
Benzocain	310	$5,424 \cdot 10^6$	1 : 100
Chlormethylacetanilid	220	$9,076 \cdot 10^6$	1 : 1000
Nipagin ^R	255	$1,432 \cdot 10^7$	1 : 1000
Benzoessäureäthylester	231	$1,141 \cdot 10^7$	1 : 1000
Pantocain ^R -Nitrat	310	$2,247 \cdot 10^7$	1 : 2000

4.6 Nachweis der Lokalanaesthetikum-Adenin-Komplexe mit Hilfe der Solubilisationsmethode

Die verwendeten Lokalanaesthetikum-Salze wurden in 0,2 m Acetatpuffer vom pH 5,00 gelöst. Es wurden jeweils 50,00 ml Lösung folgender Konzentrationen an Lokalanaesthetikum hergestellt: $0,5 \cdot 10^{-3}$ m, $1 \cdot 10^{-2}$ m, $2 \cdot 10^{-2}$ m.

Je 25 ml dieser Lösungen wurden 4 Stunden in doppelwandigen Schüttelgefäßen, die mit Hilfe eines Ultrathermostaten auf $25^\circ \pm 0,1^\circ$ temperiert wurden, mit einem Überschuß

an Adenin geschüttelt. Anschließend wurde von dem nicht in Lösung gegangenen Adeninrest abfiltriert (Filter SS 597). Die ersten 5 ml des Filtrates wurden jeweils verworfen. 5,00 ml des klaren Filtrates wurden mit 100 ml 0,2 m KH_2PO_4 -Lösung und Wasser auf 1000,0 ml verdünnt und die Extinktion dieser Lösung in einem Beckman DU Spektrophotometer bei 260 nm gemessen. Der Zusatz der Phosphatlösung zur Messlösung erfolgte, um pH-bedingte Veränderungen des molaren Extinktionskoeffizienten auszuschließen. Der molare Extinktionskoeffizient des Adenins bei 260 nm und einem pH-Wert der Messlösung von 4,75 beträgt $13,7 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$.

Gemessen wurde jeweils gegen eine in gleicher Weise filtrierte und verdünnte Lösung der restlichen nicht mit Adenin geschüttelten 25 ml der jeweiligen Lokalanaesthetikum-Lösung.

4.9 Spektrophotometrische Untersuchung der Lokalanaesthetikum-Adenin-Komplexe

Das Pantocain-Spektrum wurde durch Messung einer $2,50 \cdot 10^{-1} \text{ m}$ Lösung von Pantocain in 0,2 m KH_2PO_4 -Lösung, die mit KOH auf pH 6,06 eingestellt war, gegen die reine Pufferlösung erhalten.

Die Aufnahme des Pantocain-AMP-Differenzspektrums erfolgte durch Messung einer Lösung von AMP ($0,10 \text{ m}$) und Pantocain ($2,50 \cdot 10^{-4} \text{ m}$) in 0,2 m KH_2PO_4 -Lösung gegen eine $0,10 \text{ m}$

AMP-Lösung in 0,2 m KH_2PO_4 -Lösung. Der pH-Wert dieser beiden Lösungen war 6,06.

Bei der Messung der Cinchocain-Spektren wurde in gleicher Weise verfahren, jedoch war die Konzentration an Cinchocain jeweils $1,25 \cdot 10^{-3}$ m. Die Messung wurde in 1 mm Quarzküvetten im Beckman Spektralphotometer DU durchgeführt. Zur Aufnahme der Cinchocain-Spektren bei tiefen Temperaturen wurde das temperierbare Küvettengehäuse des Spektralphotometers mit Hilfe eines Kälte-Thermostaten auf $-10^\circ \pm 0,1^\circ$ gekühlt.

4.10 Messung der Enzymkinetiken

Zur Messung der Enzymkinetiken wurde folgender Inkubationsansatz in Glasküvetten von 1,00 cm Schichtdicke zusammengestellt:

ATP $3,31 \cdot 10^{-5}$ m bis $12,41 \cdot 10^{-5}$ m, jeweils enzymatisch bestimmt. Die ATP-Konzentrationen waren so gewählt, daß beim Auftragen ihrer reziproken Werte etwa gleiche Koordinatenabschnitte erhalten wurden.

3-PG $6 \cdot 10^{-3}$ m,

DPNH $2 \cdot 10^{-4}$ m,

MgSO_4 $4 \cdot 10^{-3}$ m,

Procain bzw. Diaethylaminoäthanolhydrochlorid $1,0 \cdot 10^{-2}$ m bis $10,0 \cdot 10^{-2}$ m,

in Triäthanolaminhydrochlorid - Puffer ($2 \cdot 10^{-2}$ m) gelöst zu 2,47 ml. pH-Wert der Lösung 7,6.

Die so vorbereiteten Messküvetten wurden mindestens eine Stunde in einem Ultrathermostaten auf $25,0^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ temperiert. Anschließend wurde die Messung in dem ebenfalls auf 25° temperierten Küvettengehäuse des Beckman Spektrophotometers DB durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Einbringen von 30 μ l Enzymsuspension, die 0,1 mg GAPDH und 0,025 mg PGK (Handelspräparate Boehringer) im ml enthielten. Die zeitliche Abnahme der Extinktion bei 366 nm wurde mit einem Schreiberzusatz registriert. Aus der Steilheit der Kurven wurden die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 ermittelt.

Zusammenfassung

Ausgehend von den neueren Ergebnissen der Elektrophysiologie des Nerven wurde untersucht, inwieweit Thiaminphosphate bei dem Na^+ -Einstrom in der ersten Phase der Nervenenerregung beteiligt sein können. Dabei wurden die Bildungskonstanten der Komplexe von Na^+ - und K^+ -Ionen mit Thiamindiphosphat und Thiamintriphosphat quantitativ bestimmt und eine ATP:TDP-Phosphotransferase-Aktivität im Nervengewebe nachgewiesen. Es wurde festgestellt, daß Thiamintriphosphat alle Voraussetzungen erfüllt, die von einem Natrium-Carrier in der ersten Erregungsphase zu fordern sind.

Die Komplexbildung zwischen Lokalanaesthetika und Thiamin bzw. Adenin wurde quantitativ untersucht. Weiterhin konnten Veränderungen von Lokalanaesthetikum-Spektren durch AMP festgestellt werden.

Durch enzymkinetische Messungen wurde die Hemmung einer Phosphotransferase-Reaktion durch Lokalanaesthetika nachgewiesen. Als Mechanismus der Hemmung wurde die Bildung eines Hemmstoff-Substrat-Komplexes zwischen Lokalanaesthetika und ATP erkannt.

Bei einer Reihe von homologen und isomeren Alkoxybenzoesäureestern wurde ein Zusammenhang zwischen der pharmakologischen Wirkung einerseits und dem Verteilungskoeffizienten und der oben erwähnten Komplexbildungskonstanten andererseits nachgewiesen.

Literatur

1. P. Fildes
D.D. Woods
J. Soc. Chem. Ind.
59, 133 (1940)
2. K.H. Beyer,
Fortschritte der Arznei-
mittelforschung.
2, 45 (1960)(Übersichtsreferat)
3. E.G. Gray
Endeavour
23, 61 (1964)
4. I. Tasaki
Amer. J. Physiol.
125, 380 (1939)
5. I. Tasaki
Amer. J. Physiol.
127, 211 (1939)
6. C. Pfaffmann
J. cell. comp. Physiol.
16, 407 (1940)
7. A.F. Huxley,
R. Stämpfli
J. Physiol. (Lond.)
108, 315 (1949)
8. A.F. Huxley,
R. Stämpfli
Arch. Sci. Physiol.
3, 435 (1949)
9. U. Gessler
Pflüg. Arch. ges. Physiol.
259, 165 (1954)
10. J.J. Lussier,
W.A.H. Rushton
J. Physiol. (Lond.)
117, 87 (1952)
11. A.L. Hodgkin
Biol. Rev.
26, 339 (1951)

- | | |
|----------------------------------|--|
| 12. A.L. Hodgkin
R.D. Keynes | J. Physiol. (Lond.)
<u>128</u> , 28 (1955) |
| 13. P.C. Caldwell | J. Physiol. (Lond.)
<u>132</u> , 35 P (1956) |
| 14. P. Greengard,
R.W. Straub | J. Physiol. (Lond.)
<u>138</u> , 32 P (1957) |
| 15. W.O. Fenn,
R. Gerschman | J. Gen. Physiol.
<u>33</u> , 195 (1950) |
| 16. S.L. Cowan | Proc. Roy. Soc. B
<u>115</u> , 216 (1934) |
| 17. A.M. Shanes | J. Gen. Physiol.
<u>33</u> , 643 (1950) |
| 18. R. Höber | Pflüg. Arch. ges. Physiol.
<u>106</u> , 599, (1905) |
| 19. J. Bernstein | Elektrophysiologie, Braunschweig
f. Viehweg und Sohn (1912) |
| 20. A.L. Hodgkin,
B. Katz | J. Physiol. (Lond.)
<u>108</u> , 37 (1949) |
| 21. S. Weidmann | J. Physiol. (Lond.)
114, 372 (1951) |
| 22. H. Kilb
R. Stämpfli | Helv. physiol. pharmacol. Acta
<u>14</u> , 251 (1956) |
| 23. S. Weidmann | J. Physiol. (Lond.)
<u>127</u> , 213 (1955) |

24. H. Ch. Lüttgau *Experientia* (Basel)
 12, 482 (1956)
25. R. D. Keynes *J. Physiol.* (Lond.)
 114, 119 (1951)
26. A. Krogk *Proc. roy. Soc. B.*
 133, 140 (1946)
27. A. L. Hodgkin,
 A. F. Huxley,
 B. Katz *Arch. Sci. physiol.*
 3 , 129 (1949)
28. A. L. Hodgkin,
 A. F. Huxley *Cold Spr. Harb. Symp.quant Biol.*
 17, 43 (1952)
29. J.CH. Skou *Biochem. Biophysic. Acta*
 23, 394 (1957)
30. J.CH. Skou *Biochem. Biophysic. Acta*
 42, 6 (1960)
31. J.CH. Skou *Biochemic. and Biophysic. Research*
 Communic.
 10, 79 (1963)
32. J.CH. Skou *Proc. of the first internat.*
 pharmacol. meeting, vol. 4,
 p. 41, Pergamon Press,
 London 1963
33. L. E. Hokin,
 M. R. Hokin *J. Biol. Chem.*
 233, 818, 822, (1958)
34. L. E. Hokin *Fed. Proc.*
 M. R. Hokin 19, 130 (1960)

57. H. P. Gurtner Helv. physiol. pharmacol. Acta
 15, C 66 (1957)
58. H. P. Gurtner Helv. physiol. pharmacol. Acta
 Suppl. 11, 1 (1961)
59. G. E. Bonvicino Int. Z. Vitaminforsch.
 D. J. Hennessy 30, 97 (1959)
60. H. Doi Vitamins (Kyoto)
 12, 319 (1957)
61. G. Schwarzenbach,
 A. Willi,
 R. O. Bach Helv. chim. Acta
 30, 1303 (1947)
62. G. Schwarzenbach,
 A. Ackermann Helv. chim. Acta
 31, 1029 (1948)
63. N. C. Melchior J. biol. Chemistry
 208, 615 (1954)
64. R. R. Williams,
 A. E. Ruehle J. Amer. chem. Soc.
 57, 1856 (1935)
65. B. Libet Fed. Proc.
 7, 72 (1948)
66. A. Rothstein Protoplasmatologia
 Bd. II, E 4, Wien 1954
67. E. Mölbert Histochemie
 2, 5 (1960)
68. V. Hanzon Exp. Cell Res.
 G. Toschi 16, 256 (1959)

69. Tasaki
Jap. J. Physiol.
3, 13 (1952)
70. K. H. Kiessling
Biochem. Biophys. Acta
46, 603 (1961)
71. G. Rindi,
L. de Giuseppe
Experientia
16, 447 (1960)
72. G. Rindi
L. de Giuseppe
Int. Z. Vitaminforschg.
31, 321 (1961)
73. C. Plotka,
M. Peterfalvi
Compt. rend. soc. biol.
142, 836 (1948)
74. I. I. Bashlykow,
A. G. Markin
Uchenye Zapiski Molotov.
Gosudarst. Univ. im.A. M.
Gor'kogo 7, Nr. 3, 113 (1955)
ref. C.A. 51, 7537 e (1957)
75. L. G. de Caro,
G. Ferrari,
L. de Caro
Bol. Soc. Ital. Biol. Sper.
35, 1926 (1959)
ref. C.A. 56, 1855 h (1962)
76. R. W. Gerard
Physiol. Rev.
12, 469 (1932)
77. R. W. Gerard
Science
122, 225 (1955)
78. P. C. Caldwell
J. Physiol. (Lond.)
132, 35 P (1956)
79. F. Brink,
D.W. Bronk,
F.D. Carlson,
C.M. Conelly
Cold Spr. Harb. Symp. quant.
Biol. 17, 53 (1952)

80. H. S. Gasser Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.
17, 32 (1952)
81. J. D. Robertson J. biophys. biochem. Cytol.
1, 271 (1955)
82. K. Ahmed,
J. D. Judah,
H. Wallgren Biochem. Biophys. Acta
69, 428 (1963)
83. B. Pinner,
J. F. Davison,
J. B. Campbell Science
145, 936 (1964)
84. G. I. Roskin,
M. Teodorescu Tsitologiya
5, 97 (1963)
ref. C.A. 59, 5557 a (1963)
85. S. Weidmann J. Physiol. (Lond.)
129, 568 (1955)
86. C. Rohmann Arch. Pharm.
B. Scheurle 274, 110, 225, 236 (1936)
87. C. Rohmann Arch. Pharm.
A. Koch 276, 189 (1938)
88. C. Rohmann Arch. Pharm.
W. Haas 278, 425 (1940)
89. W. Laubender L. Hunn, Dissertation
L. Hunn Frankfurt am Main 1960

90. P.J. Watson J. Pharmacy Pharmacol.
12, 257 (1960)
91. K. V. Thimann Arch. Biochem.
2, 87 (1943)
92. R. Straub Helv. physiol. pharmacol. Acta
12, C 89 (1954)
93. R. Straub Helv. physiol. pharmacol. Acta
14, 1 (1956)
94. R. Stämpfli Arch. exp. Path. Pharmacol.
228, 29 (1956)
95. A. v. Muralt Neue Ergebnisse der Nervenphys.
S. 58, Springer Verlag, Berlin,
Göttingen, Heidelberg, 1958
96. S. Ehrenpreis Nature
201, 887 (1964)
97. H.L. Schmitz, J. Pharmacol.
A.S. Loevenhart 24, 159, 167 (1925)
98. H. Vanderhaege, J. Pharm. Pharmacol.
P. Kolosy, 6, 119 (1954)
M. Claesen
99. P. Kolosy, J. Pharm. Pharmacol.
P. Teyssie, 7, 477 (1955)
H. Vanderhaege
100. A. Hardt Arch. exp. Path. Pharmacol.
A. Fleckenstein 207, 39 (1949)

113. J.L. Webb Enzyme and Metabolic Inhibitors
Vol. I, p. 153, 173, Academic
Press, New York and London,
1963
114. K. Yagi, Biochim. Biophysica Acta
J. Okuda, 34, 372 (1959)
T. Ozawa,
K. Okada
115. K. Yagi, Biochim. Biophysica Acta
T. Ozawa, 35, 102 (1959)
K. Okada
116. A.S. Kuperman, Science,
M. Okamoto, 144, 1222 (1964)
A.M. Beyer,
W.A. Volpert
117. R. Hazard, J. Physiol. (Paris)
J. Cheymol, 52, 116 (1960)
P. Lechat,
D. Deleau
118. A. Quevauviller, J. Physiol. (Paris)
M.J. Laroche 53, 454 (1961)
119. H. Grasshof Fortschritte d. Arzneimittel-
forschung
4, 370 (1962)
120. H. Ritsert Inaugural-Dissertation
Frankfurt am Main, 1955
121. L. de Giuseppe, J. Chromatogr.
G. Rindi 1 , 545 (1958)
122. M. Viscontini, Helv. chim. Acta
G. Bonetti, 34, 1384 (1951)
C. Ebnöther,
P. Karrer

Lebenslauf

Am 15. Mai 1937 wurde ich in Frankfurt am Main-Höchst geboren, besuchte dort von 1943 bis Herbst 1947 die Volksschule und anschließend das Leibniz-Realgymnasium, wo ich im Frühjahr 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Meine zweijährige Praktikantenzeit in der Pelikan-Apotheke in Frankfurt am Main - Zeilsheim beendete ich mit der Pharmazeutischen Vorprüfung in Wiesbaden im März 1959.

Vom Sommersemester 1959 bis zum Wintersemester 1961/62 studierte ich Pharmazie an der Universität Frankfurt am Main und bestand dort im Mai 1962 die Pharmazeutische Prüfung.

Nach sechsmonatiger Kandidatenzeit begann ich im Wintersemester 1962/63 am Pharmazeutischen Institut der Universitäts Frankfurt an Main unter der Anleitung von Herrn Dozenten Dr. Eckert mit der Anfertigung dieser Dissertation.

Seit März 1964 verwalte ich die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten am Pharmazeutischen Institut.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Dozenten Dr. Th. Eckert, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für die Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ.

